

Université de Montréal

**Étude de la sérotonine et d'effecteurs spermatiques comme
stimuli dans la signalisation des complexes ovocyte-cumulus
de souris.**

par
Pascal Amireault

Programme de Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Philosophæ Doctor (Ph.D.) en Sciences Biomédicales

Avril, 2005

© Pascal Amireault, 2005



W

4

U58

2005

V.186



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Étude de la sérotonine et d'effecteurs spermatiques comme stimuli dans la
signalisation des complexes ovocyte-cumulus de souris.**

Présentée par :
Pascal Amireault

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr André DeLéan, président-rapporteur
Dr François Dubé, directeur de recherche
Dr Laurent Descarries, membre du jury
Dr Hugh J. Clarke, examinateur externe
Dr Jean St-Louis, représentant du doyen de la FES

À Josée, sans qui tout cela aurait été impossible

À Chris, Ben, Mélanie, pour leur amitié et leur support constant

À François, Geneviève, Sophie, qui ont fait de moi ce que je suis

Table des matières :

Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des sigles et abréviations.....	ix
Résumé.....	xii
Abstract	xiv
Chapitre 1 : Introduction générale	1
1.1 Modèle murin en recherche sur la reproduction	2
1.2 Anatomie du tractus génital de la souris femelle	4
1.2.1 L'ovaire	4
1.2.2 L'oviducte	6
1.2.3 L'utérus	8
1.2.4 Le vagin.....	8
1.3 Ovogénèse et folliculogénèse.....	8
1.3.1 Des cellules germinales primordiales à l'ovocyte.....	10
1.3.2 Du follicule primitif au follicule secondaire	10
1.3.3 Du follicule tertiaire à l'ovulation.....	11
1.3.4 L'atrésie.....	13
1.4 Stéroïdogénèse ovarienne.....	13
1.5 Les cellules du cumulus	16
1.6 L'ovocyte	19
1.6.1 Maturation cytoplasmique.....	19
1.6.2 Maturation nucléaire	20
1.6.3 Influence paracrine de l'ovocyte sur le follicule.....	22
Chapitre 2 : Introduction L'activation ovocytaire	24
2.1 Hypothèse générale	25
2.1.1 Spermatozoïde "bombe-conduit" à calcium.....	27
2.1.2 Activation ligand-récepteur.....	28
2.1.3 Facteur spermatique activateur	29
2.2 Facteurs spermatiques potentiels	30
2.2.1 L'oscilline	30
2.2.2 Tr-kit	32
Chapitre 3 : Introduction La sérotonine	34
3.1 Origine historique et évolutive de la sérotonine et de ses récepteurs	35
3.2 Les membres d'un système sérotoninergique	36
3.2.1 Les enzymes de synthèse de la sérotonine	37
3.2.1.1 Les tryptophane hydroxylase 1 et 2	37
3.2.1.2 La décarboxylase des acides aminés L aromatiques	40
3.2.2 Les récepteurs à sérotonine	40
3.2.2.1 La famille 5-HT ₁	41
3.2.2.2 La famille 5-HT ₂	43
3.2.2.3 La famille 5-HT ₃	47
3.2.2.4 La famille 5-HT ₄	48
3.2.2.5 La famille 5-HT ₅	49

3.2.2.6 La famille 5-HT ₆	50
3.2.2.7 La famille 5-HT ₇	51
3.2.3 Le transporteur membranaire à sérotonine	53
3.2.4 Les enzymes de dégradation de la sérotonine	55
3.3 Systèmes sérotoninergiques, grands axes endocriniens et stéroïdogénèse	56
3.3.1 Glande surrénale et corticostéroïdes	57
3.3.2 Testicule et testostérone	58
3.3.3 Ovaire, estradiol et progestérone	59
3.4 La sérotonine : régulateur local de la fonction reproductrice femelle	60
3.4.1 Chez les invertébrés marins bivalves	60
3.4.2 Chez la palourde <i>Spisula solidissima</i>	62
3.4.3 Chez les némertes <i>Cerebratulus lacteus</i> et <i>Micrura alaskensis</i>	64
3.4.4 Chez le poisson <i>Fundulus heteroclitus</i>	65
3.4.5 Chez les grenouilles <i>Bufo viridis</i> et <i>Xenopus laevis</i>	65
3.4.6 Chez le hamster doré <i>Mesocricetus auratus</i>	66
3.5 La sérotonine et le développement embryonnaire précoce	67
3.6 La sérotonine et le développement embryonnaire tardif	69
Objectifs	70
Chapitre 4 : Articles originaux	73
4.1 Clonage, séquençage et analyse d'expression de la glucosamine-6-phosphate déaminase (GNPDA/oscilline) de souris.	74
Abstract	76
Introduction	77
Materials and methods	81
Results	86
Discussion	90
Acknowledgments	94
References	95
Figures	101
4.2 Signalisation via l'AMPc et le calcium intracellulaire induite par la sérotonine dans les complexes ovocyte-cumulus de souris	110
Abstract	113
Introduction	114
Material and methods	117
Results	122
Discussion	127
Acknowledgments	132
References	133
Figures	140
4.3 La sérotonine et son transport sensible aux antidépresseurs dans les complexes ovocyte-cumulus et embryons de souris	151
Abstract	153
Introduction	154
Materials and Methods	157
Results	162
Discussion	165

Acknowledgments.....	169
References	170
Figures.....	176
Chapitre 5 : Résultats complémentaires.....	184
5.1 Mise en situation	185
5.2 Matériel et méthodes	185
5.3 Résultats	188
Chapitre 6 : Discussion générale et conclusion	203
6.1 La protéine oscilline comme facteur spermatique	204
6.2 La protéine tr-kit comme facteur spermatique	205
6.3 La protéine PLC ζ comme facteur spermatique	206
6.4 La sérotonine comme régulateur calcique des ovocytes	207
6.5 Le système sérotoninergique des complexes ovocyte-cumulus.....	208
6.6 Fonctions potentielles du système sérotoninergique des complexes ovocyte-cumulus	212
6.7 La sérotonine et le développement embryonnaire pré-implantatoire.....	217
6.8 Contribution éventuelle des modèles de souris « knockout »	218
6.9 Implications cliniques potentielles.....	219
Bibliographie.....	220

Liste des tableaux

Tableau 1.1

Caractéristiques de la souris européenne *mus musculus* de laboratoire. page 3

Tableau 3.1

Principales caractéristiques des familles de récepteurs à 5-HT. page 42

Tableau 3.2

Affinité (pEC_{50} et pK_i) de divers ligands pour les récepteurs 5-HT₂. page 45

Tableau 5.1

Oligonucléotides utilisés pour l'obtention de la séquence complète du récepteur 5-HT₇ de hamster doré. page 186

Tableau 5.2

Oligonucléotides utilisés pour l'obtention de la séquence complète du récepteur 5-HT_{2A} de hamster doré. page 187

Cette liste ne comprend pas les tableaux inclus dans les articles

Liste des figures

Figure 1.1

Anatomie du système reproducteur de la souris femelle. page 5

Figure 1.2

Résumé des stades du développement embryonnaire pré-implantatoire. page 7

Figure 1.3

Résumé des principaux stades de la folliculogénèse. page 9

Figure 1.4

Principaux stéroïdes, enzymes et voies métaboliques impliqués dans la stéroïdogénèse ovarienne. page 14

Figure 5.1

Représentation des différents clones de récepteur 5-HT₇ de hamster doré séquencés. page 190

Figure 5.2

Séquence en nucléotides et en acides aminés déduite du récepteur 5-HT₇ de hamster doré. page 191

Figure 5.3

Comparaison de la séquence en acides aminés déduite du récepteur 5-HT₇ de hamster doré avec les récepteurs 5-HT₇ de rat, de souris et d'humain. page 193

Figure 5.4

Représentation des différents clones de récepteur 5-HT_{2A} de hamster doré séquencés. page 196

Figure 5.5

Séquence en nucléotides et en acides aminés déduite du récepteur 5-HT_{2A} de hamster doré.

page 197

Figure 5.6

Comparaison de la séquence en acides aminés déduite du récepteur 5-HT_{2A} de hamster doré avec les récepteurs 5-HT_{2A} de hamster chinois, de rat, de souris et d'humain.

page 199

Figure 5.7

Expression de l'ARNm des récepteurs 5-HT₇ et 5-HT_{2A} dans les ovocytes et cellules du cumulus de hamster doré.

page 202

Figure 6.1

Système sérotoninergique des complexes ovocyte-cumulus de souris.

page 210

Cette liste ne comprend pas les figures incluses dans les articles

Liste des sigles et abréviations

ACTH : hormone adrénocorticotrope

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNr : acide ribonucléique ribosomal

ATP : adénosine triphosphate

BAPTA-AM : 126150-97-8 / Glycine, N,N'-[1,2-ethanediylbis(oxy-2,1-phenylene)]bis[N-[2-[(acetyloxy) methoxy]-2-oxoethyl]]-, bis[(acetyloxy)methyl] ester

BMP-6 : protéine morphogénique de l'os 6

Ca²⁺ : calcium ionisé

CAM kinase II : Ca²⁺/calmoduline kinase II

CDK1 : kinase cycline dépendante 1

CICR : relâche de calcium induite par le calcium

COC : complexe ovocyte cumulus

cM : centi Morgan

CRF : facteur de relâche de la corticotropine

DAG : diacyl glycérol

DHEA : déhydroépiandrostérone

DTT : dithiothréitol

EC₅₀ : concentration efficace médiane

EGF : facteur de croissance de l'épiderme

ERK : kinase régulée par un signal extracellulaire

GABA : acide γ -amino butyrique

GDF-9 : facteur de croissance et de différenciation 9

GDF-9B : facteur de croissance et de différenciation 9B

GDP β S : guanosine 5'-[β -thio]diphosphate

CGP : cellules germinales primordiales

GH : hormone de croissance

GNPDA : glucosamine-6-phosphate déaminase

GnRH : hormone de libération des gonadotrophines

GTP γ S : guanosine 5'-[β -thio]triphosphate

GVBD : rupture de la vésicule germinale

hCG : gonadotrophine chorionique humaine

ICSI : injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde

ICS 205930 : 3-tropanylindole-3-carboxylate

IC₅₀ : concentration inhibitrice médiane

IGFs : facteurs de croissance apparentés à l'insuline

IP3 : inositol 1,4,5-trisphosphate

kb : kilobases

kDa : kilo dalton

LSD : acide lysergique diéthylamide

MAP kinase : protéine kinase activée par le mitogène

MDL 72222 : 3-Tropanyl-3,5-dichlorobenzoate

MPF : facteur de promotion de la maturation

pb : paire de bases

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

PKC : protéine kinase C

PLC : phospholipase C

pI : point isoélectrique

PiP₂ : phosphatidyl inositol diphosphate

PMA : phorbol 12-myristate 13-acétate

PPB : 2-[1-(4-piperonyl) piperaziny] benzothiazole

RACE : amplification rapide des extrémités d'ADNc

RCPG : récepteur couplé aux protéines G

RT-PCR : réverse transcription suivi d'un PCR

SB269970 : (R)-3-(2-(2-(4-méthylpiperidine-1-yl)-éthyl)pyrrolidine-1-sulfonyl)phenol

SERT : transporteur à sérotonine

SNAP-25 : protéine associée aux synaptosomes de 25 kDa

SSRI : inhibiteur spécifique de la recapture de la sérotonine

TFMPP : 1-(α,α,α -trifluoro-*m*-tolyl)piperazine

TGF β : facteur de croissance tumorale β

TPEN : N,N,N',N'-tétrakis(2-pyridylméthyl)éthylènediamine

U73122 : 1-[6-[[(17β) -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1*H*-pyrrole
2,5-dione

VIP : peptide vasoactif intestinal

WAY100135 : (S)-N-tert-butyl-3-(4-(2-méthoxyphényl)piperazine-1-yl)-2-
phénylpropanamide

3 β HSD : 3 β -hydroxystéroïde déhydrogénase

5-HT : sérotonine, 5-hydroxytryptamine

8-OH DPAT : 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)tétraline

17 β HSD : 17 β -hydroxystéroïde déhydrogénase

17,20 β P : 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one

Résumé

Les ovocytes de mammifères subissent l'influence d'une variété de facteurs au cours de leur maturation et lors des événements menant à la formation et au développement d'un nouvel embryon. Ces facteurs sont sécrétés par les cellules somatiques qui entourent l'ovocyte lors de sa maturation dans l'ovaire, sont transportés par le spermatozoïde à la fécondation et se trouvent dans le système reproducteur de la mère au cours du développement embryonnaire.

Nous avons étudié deux facteurs spermatiques potentiellement impliqués dans l'activation ovocytaire : les protéines oscilline et tr-kit. Chez le hamster doré, il a été proposé que l'oscilline agisse comme facteur spermatique provoquant l'activation de l'ovocyte, mais chez la souris, tr-kit, a été proposée pour l'accomplissement d'un tel rôle. Dans le but d'élucider cette ambiguïté, nous avons caractérisé l'homologue murin de l'oscilline de hamster et nous en avons vérifié l'expression avec celle de tr-kit. La séquence de l'oscilline de souris montre plus de 96% d'identité avec ses homologues de hamster et d'humain. Des analyses par RT-PCR et immunobuvardage indiquent que l'oscilline est exprimée dans tous les tissus étudiés, contrairement à tr-kit qui n'est exprimée que dans le testicule. Des études d'immunofluorescence indirecte à l'aide d'anticorps spécifiques ont aussi démontré que l'oscilline est présente dans l'acrosome du spermatozoïde et qu'elle est perdue lors de la réaction d'acrosome, précédant la fécondation, alors que tr-kit est présente dans la région du cou du spermatozoïde. Nos résultats démontrent donc que l'oscilline de souris, contrairement au tr-kit, ne peut pas être un facteur spermatique activateur de l'ovocyte, tel que préalablement suggéré.

Nous nous sommes aussi intéressés à la sérotonine (5-HT), une neurohormone impliquée dans une variété de phénomènes physiologiques. Plusieurs études ont tenté de démontrer l'implication locale de la 5-HT dans la maturation folliculaire et ovocytaire, mais sans clairement identifier les effecteurs impliqués. Nous avons donc vérifié la présence d'un système sérotoninergique dans les complexes ovocyte-cumulus et les embryons de souris, en procédant à l'analyse de l'expression de différents effecteurs sérotoninergiques, par RT-PCR, immunobuvardage et immunofluorescence indirecte en

microscopie confocale. Nos résultats révèlent la présence de 5-HT dans les ovocytes et les cellules du cumulus. Ce phénomène s'explique par l'expression de l'enzyme de synthèse, tryptophane hydroxylase 1, dans les cellules du cumulus et celle du transporteur spécifique à 5-HT (SERT) dans les ovocytes et les cellules du cumulus. De plus, le récepteur 5-HT₇ est détecté dans ces deux types cellulaires alors que les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B} ne sont détectés que dans les cellules du cumulus. Nous avons aussi pu démontrer que la 5-HT régule le niveau des seconds messagers AMPc et du calcium dans les cellules du cumulus. Grâce à une méthode semi-quantitative permettant la mesure de l'incorporation de 5-HT dans un seul ovocyte, nous avons constaté que les ovocytes de souris incorporent la 5-HT via un mécanisme sensible aux inhibiteurs spécifiques du transporteur à 5-HT. Le SERT est exprimé et fonctionnel dans les ovocytes jusqu'au stade blastocyste, alors que le récepteur 5-HT₇ disparaît à partir du stade 8 cellules. La présence de 5-HT et l'expression du récepteur 5-HT₇, du récepteur 5-HT_{2A} et d'un SERT fonctionnel dans les complexes ovocyte-cumulus de hamster doré suggère que l'expression d'un tel système sérotoninergique soit répandu à l'ensemble des mammifères. Cette première démonstration d'une organisation sérotoninergique tant dans les complexes ovocyte-cumulus que dans les embryons ouvre la voie à une clarification du rôle local de la 5-HT sur la croissance folliculaire, la maturation ovocytaire et le développement embryonnaire pré-implantatoire chez les mammifères.

Mots clé : Ovocyte, complexe ovocyte-cumulus, oscilline, tr-kit, activation ovocytaire, sérotonine, système sérotoninergique, souris, hamster doré

Abstract

Mammalian oocytes are regulated by several factors while maturing and in the early events leading to fertilization and early embryonic development. These factors can be produced by the somatic cells surrounding the oocyte while it completes its ovarian maturation, carried by the spermatozoon at fertilization and are found in the mother reproductive tract during embryonic development.

We studied two such factors potentially involved in oocyte activation : the oscillin and tr-kit proteins. In the golden hamster model, it was proposed that oscillin could activate the oocyte by being injected into it at fertilization, while the same function was proposed for tr-kit in the mouse model. In order to shed some light on this apparent discrepancy, we characterized the mouse homolog of hamster oscillin and verified its expression along with tr-kit. Mouse oscillin shows over 96% identity with its hamster and human homologs. RT-PCR and Western blot analysis show that oscillin is expressed in all studied tissues while tr-kit expression is restricted to the testis. Indirect immunofluorescence studies also showed oscillin localization in the sperm acrosome and its loss in acrosome-reacted sperm while tr-kit is localized in the connecting piece region of the sperm. Our results show that mouse oscillin, in contrast with tr-kit, does not fulfill some of the basic characteristics needed to operate as an oocyte-activating sperm factor at fertilization.

We also studied serotonin (5-HT), a neurohormone involved in several different physiological processes. Local involvement of 5-HT in follicular growth, oocyte meiotic maturation, fertilization and early development is largely unknown in mammals in contrast to its demonstrated roles in several of these aspects in lower animals such as invertebrates. However, in mammals, some scattered observations indirectly suggest the potential involvement of a serotonergic network. Our study aimed at assessing the possible presence of 5-HT itself, its classical transporter (SERT), its synthesizing enzyme tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) and three of its receptors: the 5-HT_{2A} receptor, the 5-HT_{2B} receptor and the 5-HT₇ receptor. Using RT-PCR, Western blot and indirect immunofluorescence confocal microscopy, we investigated the expression of

these selected genes. Our results reveal the presence of 5-HT in both the oocyte and the cumulus cells. The presence of 5-HT can be explained by the expression of TPH1 in cumulus cells and is associated with the expression of the SERT in both the oocyte and cumulus cells. In addition, we detected the expression of the 5-HT₇ receptor in both cell types while 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors expression is restricted to cumulus cells. We also showed that cAMP and calcium levels of cumulus cells is regulated by 5-HT. Moreover, we developed a quantitative method to measure 5-HT incorporation into single mouse oocytes and present the evidence that isolated oocytes are able to accumulate 5-HT via a specific 5-HT reuptake inhibitor-sensitive mechanism. The SERT is expressed and functional from fertilization to the blastocyst stage, whereas the 5-HT₇ receptor disappears from the 8-cell stage and beyond. Finally, we showed 5-HT presence and 5-HT₇ receptor, 5-HT_{2A} receptor and SERT expression in golden hamster cumulus-oocyte complexes suggesting that such a serotonergic network is universally expressed in mammals. These data support the view that a serotonergic network is involved in several aspects leading to oocyte meiotic maturation, follicle growth and pre-implantation development.

Keywords : Oocyte, oocyte-cumulus complex, oscillin, tr-kit, oocyte activation, serotonin, serotonergic network, mouse, golden hamster

Chapitre 1 :

Introduction générale

1.1 Modèle murin en recherche sur la reproduction

La souris est, depuis le début du siècle, un modèle animal mammifère des plus couramment utilisé dans le monde et ce, dans des domaines de recherche très variés. L'utilisation de ce modèle animal remonte au début du XX^{ième} siècle; les scientifiques de l'époque s'y sont initialement intéressés pour l'étude de la transmission génétique (Hogan *et al.*, 1994). La souris est rapidement devenu un modèle de choix grâce à sa petite taille, sa résistance aux infections, ses portées nombreuses et ses générations rapides (Tableau 1.1, page 3). L'existence de certains mutants facilement reconnaissables a contribué à rendre ce modèle très attrayant. Par exemple, l'étude de la transmission de la couleur du pelage, et du mutant *albino* en particulier, a permis les premières démonstrations de la génétique mendélienne chez la souris. Depuis, les connaissances ne cessent de s'accroître (ainsi, le génome de la souris est maintenant séquencé en entier) et les nouvelles techniques de la biologie moléculaire ont permis de mieux comprendre l'expression des gènes à des moments critiques du développement. L'accumulation de ces données moléculaires et génétiques fait de la souris un modèle expérimental de choix lorsque l'on cherche à identifier l'expression de nouveaux gènes impliqués dans les phénomènes physiologiques touchant la reproduction.

L'étude de la souris est plus complexe que celle de modèles plus primitifs, largement utilisés en reproduction, comme le Xénope, le poulet ou le poisson zèbre, puisqu'il s'agit d'un animal adapté à l'environnement protecteur et nutritif de la mère, d'où la nécessité de développer des milieux de culture. Toutefois, les rongeurs sont plus près de l'être humain et permettent, par exemple, des études *in vivo* de l'effet de produits chimiques sur le développement.

Les phénomènes touchant la maturation ovocytaire et folliculaire, la fécondation et le développement embryonnaire pré-implantatoire ont été fréquemment étudiés chez la souris. Ainsi, la souris servait déjà de modèle lors de la découverte de la reprise spontanée de la méiose à la sortie de son environnement folliculaire (Pincus and Enzmann, 1935). Encore de nos jours, elle est utilisée par plusieurs chercheurs tentant

Caractéristiques générales	
Durée de vie en laboratoire	~1,5 années
Temps de gestation	19-20 jours
Cycle oestral	4 jours
Âge de la maturité sexuelle mâle	7-8 semaines
Nombre de spermatozoïdes/éjaculation	~5 X 10 ⁷
Âge de la maturité sexuelle femelle	6-7 semaines
Nombre d'ovocytes ovulés (cycle naturel)	~10
Nombre d'ovocytes ovulés (superovulation)	~30
Nombre de portées par femelle	4-8
Portée moyenne	6-9
Âge de sevrage	3 semaines
Poids approximatif	naissance 1 g sevrage 8-12 g adulte 30-40 g (mâle>femelle)
Caractéristiques du génome	
Nombre de chromosomes	40
Contenu en ADN diploïde	environ 6 pg (3X10 ⁹ pb)
Unités de recombinaison	1600 cM (200 kb/cM)
Nombre approximatif de gènes	0,5-1,0 X 10 ⁵

Tableau 1.1 : Caractéristiques de la souris européenne *Mus musculus* de laboratoire.

Adapté de Hogan *et al.* (1994) et Wassarman and DePamphilis (1993).

d'élucider les mécanismes de la maturation méiotique des ovocytes de mammifères (Eppig, 2001; Matzuk *et al.*, 2002b; Mehlmann *et al.*, 2002; Avazeri *et al.*, 2004; Mehlmann *et al.*, 2004; LaRosa and Downs, 2005). La fécondation et les phénomènes qui y sont associés ont aussi été étudiés chez la souris, grâce à la facilité d'obtenir des ovocytes qui sont facilement fécondables *in vitro*.

Mais le plus grand avantage de la souris comme modèle expérimental est sans contredit la facilité avec laquelle il est possible de manipuler son génome, en y introduisant des mutations spécifiques et ciblées par recombinaison homologue dans les cellules souches pluripotentes. Au cours des dernières années, ces techniques ont permis d'obtenir des souris "knockout" pour certains gènes, facilitant la caractérisation des propriétés d'une grande diversité de protéines et permettant l'élaboration de nouveaux modèles expérimentaux de pathologies diverses.

1.2 Anatomie du tractus génital de la souris femelle

Le système reproducteur de la souris femelle est composé d'une paire d'ovaires, d'une paire d'oviductes et d'un utérus bicorne qui débouche sur le vagin (Figure 1.1A, page 5). Lors de la récolte d'ovocytes, les ovocytes en prophase I doivent être isolés à partir des follicules ovariens, alors que les ovocytes en métaphase II peuvent être récoltés par déchirure de l'ampoule de l'oviducte. De la même façon, les embryons 1 cellule à morula sont récoltés dans l'oviducte, alors que les blastocystes sont récoltés dans l'utérus (Figure 1.2, page 7).

1.2.1 L'ovaire

Les ovaires se trouvent rattachés au dessous du rein par du tissu adipeux et sont encapsulés dans une mince enveloppe de tissu conjonctif (Figure 1.1B, page 5). La surface de l'ovaire est couverte d'un épithélium de surface, la *tunica albuginea*, composé d'une simple couche de cellules cubiques (Gude *et al.*, 1982). Sous cet épithélium, on retrouve des follicules à différents stades de développement, des *corpora lutea*, des cellules interstitielles et des vaisseaux sanguins. Le follicule est composé d'un

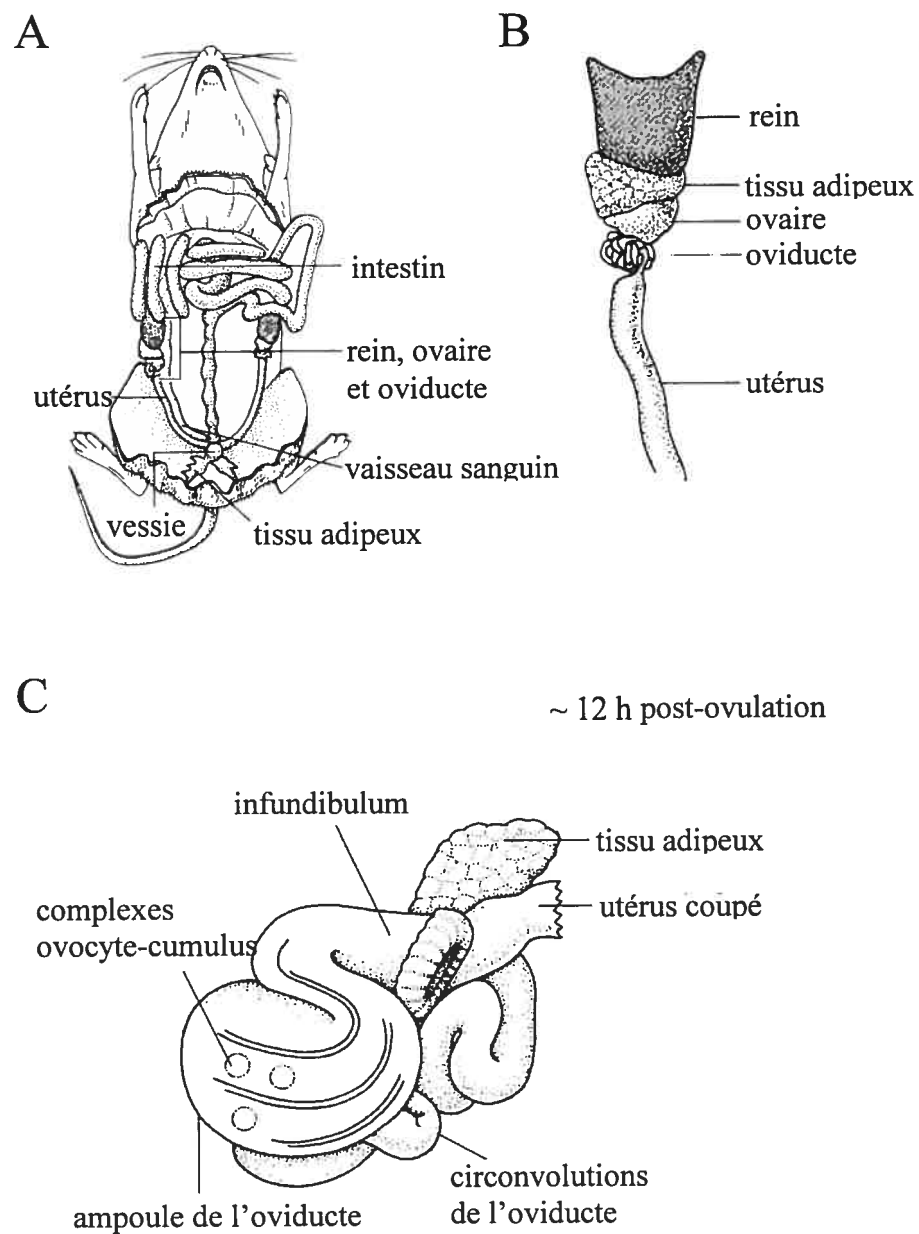


Figure 1.1 : Anatomie du système reproducteur de la souris femelle. (A) Souris en chirurgie, laissant voir le système reproducteur. (B) Grossissement de la région ovarienne. (C) Oviducte de souris, environ 12 heures après l'ovulation.

Adapté de Hogan *et al.* (1994).

ovocyte et d'au moins une couche de cellules de la granulosa, mais sa structure varie énormément en fonction de son stade de développement. Le follicule mature se trouve en périphérie de l'ovaire et, au moment de l'ovulation, la rupture du follicule permettra la libération du complexe ovocyte-cumulus (COC) et sa capture subséquente par l'oviducte.

1.2.2 L'oviducte

L'oviducte, site de la fécondation, est composé d'une couche de muscle lisse, d'une couche de tissu de support et d'une muqueuse interne composée de cellules sécrétrices et de cellules ciliées (Gude *et al.*, 1982). L'épaisseur de ces trois couches varie en fonction de leur situation le long de l'oviducte et sont sensibles au cycle ovarien. Ces changements cycliques facilitent l'entrée de l'ovocyte dans l'oviducte, l'entrée des spermatozoïdes jusqu'à l'ovocyte et le passage de l'ovocyte fécondé jusqu'à l'utérus, où il s'implantera quelques jours plus tard. Ce tube interconvolué est composé de quatre parties : l'infundibulum, l'ampoule, l'isthme et un segment intra-mural, joint à l'utérus (Burkitt *et al.*, 1993). L'infundibulum est ouvert et recouvre une partie de l'ovaire pour permettre la capture des COCs libérés lors de l'ovulation. Les mouvements péristaltiques de l'oviducte permettent la descente des complexes de l'infundibulum jusqu'à l'ampoule où se produit la fécondation (Figure 1.1C, page 5). Cette ampoule consiste en un renflement de l'oviducte, agissant un peu comme un réservoir, et se trouve gonflée par son contenu en COCs lors de la fécondation. Après la fécondation, l'embryon descendra dans l'isthme, subira ses premières divisions cellulaires et atteindra la jonction utérine au stade morula, 3 jours et demi après la fécondation (Figure 1.2, page 7).

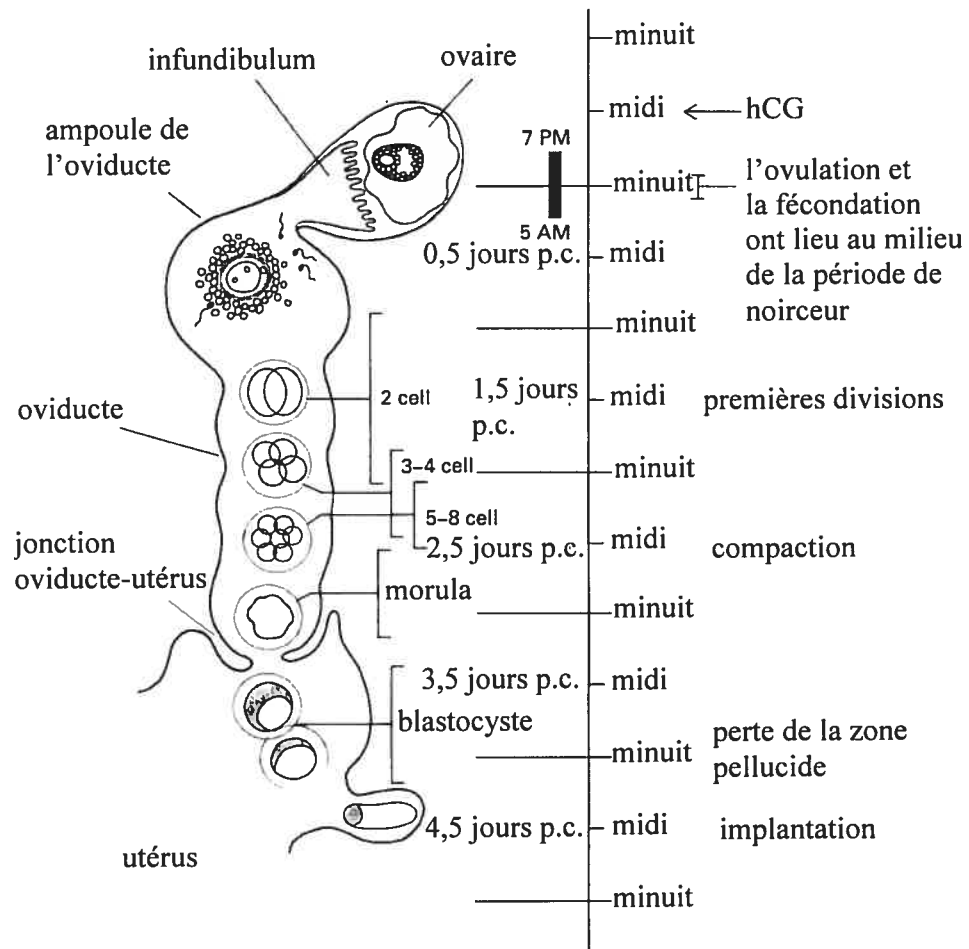


Figure 1.2 : Résumé des stades du développement embryonnaire pré-implantatoire.

Adapté de Hogan *et al.* (1994).

1.2.3 L'utérus

L'utérus est une structure composée de deux tubes en continuum avec les oviductes, qui se joignent en un seul tube vers l'extrémité vaginale (Figure 1.1A, page 5). La muqueuse de l'utérus, ou endomètre, est composé d'un épithélium cylindrique cilié, de glandes tubulaires et d'un tissu conjonctif vascularisé (Gude *et al.*, 1982). Sa paroi musculaire est composée d'une couche circulaire interne et d'une couche longitudinale externe de muscle lisse, séparées par un tissu conjonctif richement vascularisé. À l'approche de l'extrémité vaginale, l'épithélium qui l'enveloppe change d'un épithélium cylindrique à un épithélium squameux stratifié, en continuité avec le vagin.

1.2.4 Le vagin

Le vagin est constitué d'un épithélium squameux stratifié, d'une *lamina propria* fibreuse et d'une mince couche musculaire (Gude *et al.*, 1982). Pendant le cycle oestral, l'épithélium vaginal subit des changements cycliques caractérisés par une prolifération cellulaire, une cornification, une infiltration leucocytaire et varie conséquemment en épaisseur. L'observation de l'état de l'épithélium vaginal par simple frottis permet donc de connaître le stade du cycle oestral et de planifier des fécondations naturelles.

1.3 Ovogénèse et folliculogénèse

Chez les mammifères, l'ovogénèse commence au cours du développement fœtal et se termine chez l'adulte sexuellement mature. Les premières étapes impliquent la formation et la migration des cellules germinales primordiales, la multiplication et la transformation de ces cellules en ovogonies, puis leur recrutement par les gonadotrophines et leur développement intime, parallèle à celui de leur compartiment ovarien : le follicule. Le follicule commence alors une formidable expansion qui l'amènera d'un simple ovocyte, arrêté en prophase de la 1^{ère} méiose, d'environ 15 μM de diamètre et entouré de quelques cellules de pré-granulosa, à un follicule de 700 μM de

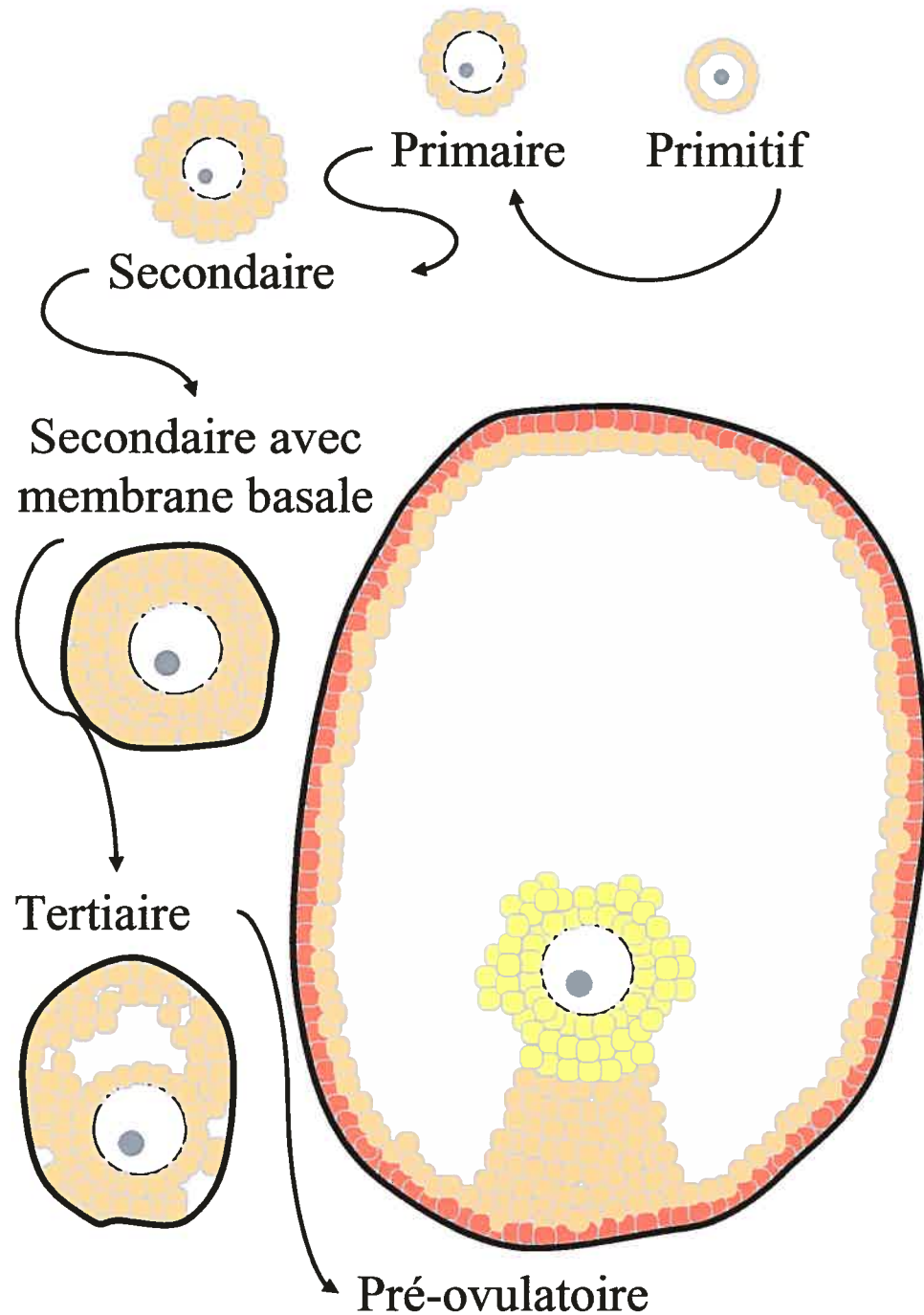


Figure 1.3 : Résumé des principaux stades de la folliculogénèse. Au stade pré-ovulatoire, on distingue les trois principaux types de cellules de la granulosa : Les cellules du cumulus (en jaune), les cellules péri-antrales (en beige) et les cellules murales (en orangé).

diamètre, contenant des milliers de cellules de granulosa et de la thèque, ainsi qu'un ovocyte, de 80 μM de diamètre, arrêté en métaphase de la seconde méiose et mûr pour l'ovulation (Figure 1.3, page 9).

1.3.1 Des cellules germinales primordiales à l'ovocyte

Les cellules germinales primordiales (CGP) sont détectées pour la première fois au jour 7.0 post-coitum, pendant la gastrulation, et proviennent de l'épiblaste (Gardner *et al.*, 1985; Ginsburg *et al.*, 1990). Les CGP (12 μM de diamètre) se trouvent alors dans l'endoderme de la région de l'allantoïde provenant de la crête primordiale (Wassarman, 1988a; Hogan *et al.*, 1994). Elles migrent et se multiplient vers la crête génitale qui deviendra le site de développement de la gonade (jour 11.0-11.5). Après avoir atteint la gonade, les CGP migrent jusqu'au cortex et avec des cellules épithéliales donnent naissance aux cordons sexuels corticaux. Dans l'embryon de 13 jours qui contient un ovaire différencié, la migration des CGP est complète et elles se transforment en ovogonies qui se divisent rapidement et possèdent des ponts intercellulaires avec les cellules qui les entourent. Au jour 12 de l'embryogénèse, environ 5% des ovogonies atteignent le stade préleptotène puis leptotène de la 1^{ère} méiose (Wassarman, 1988a; Hogan *et al.*, 1994).

C'est durant le stade préleptotène que la dernière réplication de l'ADN a lieu en préparation pour la méiose et c'est à ce moment que l'ovogonie devient un ovocyte (Bachvarova *et al.*, 1982). Au jour 17, l'ovaire ne contient plus que des ovocytes à différents stades de la 1^{ère} méiose (Speed, 1982). Au jour 18, les premiers ovocytes en phase diplotène sont observés et, à la naissance, la majorité des ovocytes sont au stade diplotène tardif. Ces petits ovocytes (12-15 μM de diamètre) resteront à ce stade de la méiose jusqu'à ce qu'ils soient recrutés pour maturer et constituent la réserve de cellules germinales pour toute la vie adulte (Wassarman, 1988a; Hogan *et al.*, 1994).

1.3.2 Du follicule primitif au follicule secondaire

À ce stade, l'ovocyte est entouré d'une couche de cellules de pré-granulosa aplaties et constitue avec celles-ci un follicule primitif dormant (Figure 1.3, page 9). Les follicules

primitifs sont recrutés de la réserve selon un mécanisme ne dépendant pas absolument de la FSH, mais qui serait favorisé par celle-ci et qui nécessiterait des signaux provenant de l'ovocyte ou des cellules de la granulosa, dont le ligand du récepteur c-kit (Peters *et al.*, 1973; Lunenfeld *et al.*, 1975; Merchant, 1975; Edwards *et al.*, 1977; Merchant-Larios and Centeno, 1981; Arendsen, 1982; Vanderhyden, 2002). Au stade primaire (Figure 1.3, page 9), des jonctions "gap" sont formées entre l'ovocyte et les cellules, devenues cubiques, qui l'entourent, ce qui permet le transfert de petites molécules entre les deux compartiments cellulaires (Anderson and Albertini, 1976; Gilula *et al.*, 1978). Par la suite, l'ovocyte se développe et une série de divisions mitotiques dans les cellules de la granulosa conduit à l'apparition d'une deuxième couche de cellules et la formation d'un follicule secondaire (Greenwald and Roy, 1994). Ce follicule secondaire (Figure 1.3, page 9) voit ensuite son ovocyte entrer en phase active de synthèse d'ARN et poursuivre sa croissance, le nombre de couches de cellules de granulosa s'additionner et se trouve infiltré par des cellules de la thèque, qui se différencient du tissu environnant et entourent les cellules de la granulosa (Moore *et al.*, 1974; Wang *et al.*, 1991; Greenwald and Roy, 1994). La thèque interne est formée de fibroblastes, de cellules stéroïdogéniques; elle est vascularisée et séparée du compartiment de la granulosa par une membrane basale (Figure 1.3, page 9), constituée principalement de laminine et de fibronectine (O'Shea *et al.*, 1978; Wordinger *et al.*, 1983; Carnegie, 1990). Au cours de son passage par les stades primaire et secondaire, le follicule requiert, entre autres, le ligand du récepteur c-kit et les gonadotrophines pour poursuivre sa maturation (Kuroda *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1991; Nayudu and Osborn, 1992; Wang and Greenwald, 1993a, b).

1.3.3 Du follicule tertiaire à l'ovulation

Par la suite, le follicule devient tertiaire (Figure 1.3, page 9) et entre dans une seconde phase de croissance où l'ovocyte ralentit sa croissance et où l'accumulation de fluide folliculaire, l'activité stéroïdogénique et l'activité mitotique des cellules de la granulosa et de la thèque deviennent prédominantes (Gore-Langton and Armstrong, 1994; Greenwald and Roy, 1994). À ce stade, l'ovocyte augmente son activité de synthèse protéique et devient dépendant des cellules qui l'entourent pour obtenir les nutriments

nécessaires à son métabolisme (Canipari *et al.*, 1979; Heller *et al.*, 1981). Toutefois, l'ovocyte influence aussi positivement l'activité mitotique des cellules du follicule et tout particulièrement les cellules de la granulosa qui sont en contact avec le fluide folliculaire (Hirshfield, 1986). Ce fluide est produit par le follicule antral jusqu'à l'ovulation et résulte essentiellement d'un transsudat du plasma et de sécrétions des cellules de la granulosa (Greenwald and Roy, 1994).

C'est à ce stade que les différences entre les diverses populations de cellules de la granulosa apparaissent de façon claire (Figure 1.3, page 9). Ainsi, on distingue les cellules du cumulus (près de l'ovocyte), des cellules péri-antrales (en bordure de l'antra) et des cellules murales (en périphérie du follicule, sous la membrane basale). Ces types cellulaires se distinguent de par leur apparence, leur activité métabolique, leur activité stéroïdogénique et leur patron d'expression des récepteurs à FSH et LH (Zoller and Weisz, 1979; Lawrence *et al.*, 1980; Hillensjo *et al.*, 1981; Zoller and Enelow, 1983; Zoller, 1984; Peng *et al.*, 1991; Rao *et al.*, 1991). La thèque externe se différencie aussi avec l'apparition de l'antra; elle est constituée de fibroblastes, de cellules musculaires lisses, de fibres de collagène et devient richement vascularisée au fur et à mesure que le follicule se développe (O'Shea, 1970; Greenwald and Roy, 1994).

À la toute fin de sa maturation, le follicule pré-ovulatoire contient une grande quantité de liquide, plusieurs milliers de cellules de granulosa et une thèque richement vascularisée. De plus, les cellules du cumulus et l'ovocyte forment un prolongement distinct des autres cellules de la granulosa et qui sera ovulé sous l'influence du pic pré-ovulatoire de LH: le *cumulus oophorus*. Ce pic de LH induit aussi les derniers changements à l'intérieur du follicule soit la reprise de la méiose de l'ovocyte, l'expansion du cumulus provoquée par une abondante sécrétion d'acide hyaluronique, la lutéinisation des cellules de la granulosa et finalement la rupture de la membrane folliculaire et l'ovulation du complexe ovocyte-cumulus 12-15 h plus tard (Gore-Langton and Armstrong, 1994; Greenwald and Roy, 1994).

Chez les rongeurs comme la souris, le hamster et le rat, le cycle ovarien est de 4 à 5 jours. En conséquence, le follicule, durant les 20-30 jours de maturation nécessaires pour passer de follicule primitif à pré-ovulatoire, sera exposé à 4 à 5 pics de FSH/LH consécutifs qui réguleront une grande quantité de facteurs de croissance et hormones

locaux agissant de façon paracrine, permettront la stéroïdogénèse du follicule et assureront la bonne coordination entre les différents compartiments cellulaires, garantissant ainsi l'ovulation d'un follicule compétent (Greenwald and Roy, 1994).

1.3.4 L'atrésie

L'atrésie, phénomène de dégénérescence ou d'apoptose du follicule, est un phénomène universel chez les vertébrés mammifères et non-mammifères et le destin d'environ 77% des follicules chez la souris (Saidapur, 1978; Byskov, 1978). Ainsi, lorsqu'un follicule est recruté pour maturer, il poursuivra son développement jusqu'à l'ovulation ou deviendra atrétique. Cette atrésie peut intervenir à tous les stades de développement et elle modifie considérablement les propriétés stéroïdogéniques du follicule et les caractéristiques de chacun des compartiments cellulaires (Greenwald and Roy, 1994).

1.4 Stéroïdogénèse ovarienne

Les stéroïdes ovariens ont tous une structure chimique de base semblable, constituée des quatre cycles apposés qui forment la base structurale du cholestérol (C_{27}), et sont de trois types : les androgènes (C_{19}), les progestines (C_{21}) et les estrogènes (C_{18}) (Gore-Langton and Armstrong, 1994).

Il existe deux compartiments cellulaires impliqués dans la stéroïdogénèse chez les mammifères : le compartiment LH-sensible qui comprend les cellules de la thèque interne et les cellules interstitielles du stroma ovarien, et le compartiment des cellules de la granulosa, FSH-sensible, et sensible à la LH seulement dans les derniers stades de la folliculogénèse (Rennels, 1951; Guraya and Greenwald, 1964; Deanesly, 1972; Gore-Langton and Armstrong, 1994). Parmi les cellules de la granulosa, les cellules murales sont les premières à développer une réponse stéroïdogénique grâce à l'acquisition de récepteurs à LH, l'expression de la 3β -hydroxystéroïde déhydrogénase (3β HSD) et du CYP11A ou cytochrome P450_{scc} (Amsterdam *et al.*, 1975; Zoller and Weisz, 1978; Zoller and Weisz, 1979). Ces deux compartiments cellulaires, de par leur sensibilité différente aux gonadotrophines, leur patron d'expression d'enzymes stéroïdogéniques

particulier et leur relation intime due à leur proximité et la présence de jonctions “gap”,

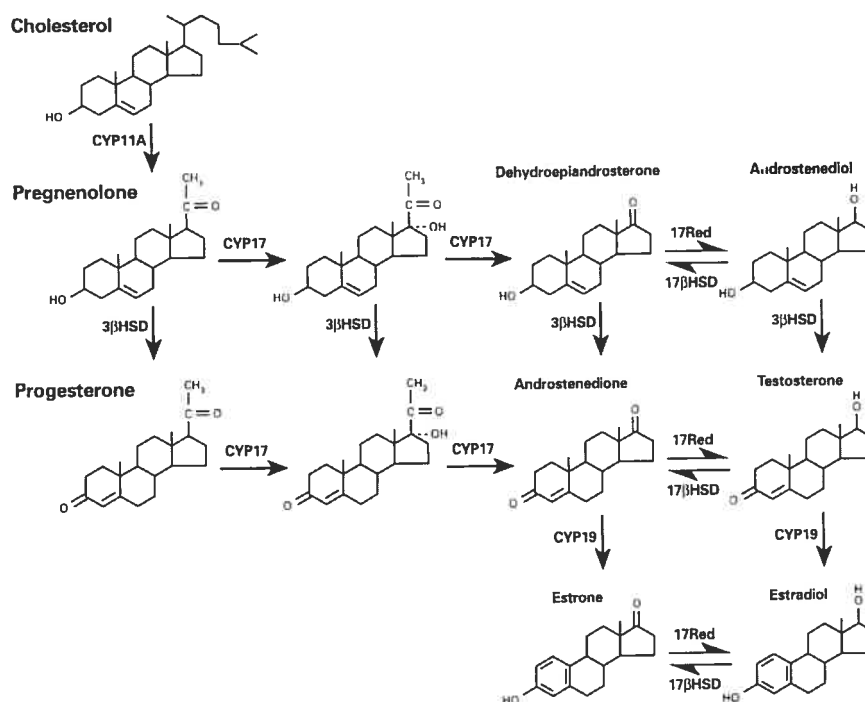


Figure 1.4 : Principaux stéroïdes, enzymes et voies métaboliques impliqués dans la stéroïdogénèse ovarienne chez les mammifères.

Tiré de O'Malley and Strott (1999).

jouent un rôle distinct, mais coopératif dans le processus de la stéroïdogénèse ovarienne. La figure 1.4 (page 14) illustre les principaux stéroïdes, enzymes et voies métaboliques impliqués dans la stéroïdogénèse.

La classe de stéroïdes principale produite par le compartiment LH-sensible est constituée des androgènes. Ceux-ci sont synthétisés à partir du cholestérol provenant majoritairement du réseau vasculaire abondant du tissu ovarien et de la thèque (Dyer *et al.*, 1985). Cette activité stéroïdogénique est principalement régulée par l'action de la LH sur son récepteur, entraînant une augmentation d'AMPc (Hamberger *et al.*, 1978; Tsang *et al.*, 1979; Zeleznik *et al.*, 1981; Oxberry and Greenwald, 1982; Henderson *et al.*, 1984). Le CYP11A est exprimé par les cellules interstitielles et dans quelques cellules de la thèque interne, et son expression est augmentée par la LH dans ces dernières (Magoffin and Erickson, 1982; Farkash *et al.*, 1986). La LH augmente l'activité du CYP17, qui est exprimé dans les cellules interstitielles et de la thèque et qui expriment aussi de façon constitutive la 3 β HSD (Bogovich and Richards, 1982; Erickson *et al.*, 1985). Ainsi, le cholestérol est transformé en pregnenolone par le CYP11A, qui pourra ensuite être converti en déhydroépiandrostérone (DHEA) par le CYP17, en progestérone par la 3 β HSD, ou en androstènedione par l'action combinée du CYP17 et de la 3 β HSD. La faible activité de la 17 β -hydroxystéroïde déhydrogénase (17 β HSD) et du CYP19 ou aromatasé dans le compartiment LH-sensible serait à l'origine de l'accumulation de ces intermédiaires et à la base du processus de coopération nécessaire entre les deux compartiments (Gore-Langton and Armstrong, 1994).

La stéroïdogénèse du compartiment de la granulosa, et surtout l'absence ou la faible expression du CYP17, imposent l'aromatisation des androgènes produits par le compartiment LH-sensible en estrogènes, et permet la synthèse *de novo* de la progestérone et de ses métabolites grâce à l'expression du CYP11A et de la 3 β HSD (Gore-Langton and Armstrong, 1994). Le compartiment de la granulosa est le site d'expression majoritaire du CYP19, lequel est stimulé par la FSH via l'activation de son récepteur et une augmentation d'AMPc (Zeleznik *et al.*, 1974; Dorrington *et al.*, 1975; Gore-Langton and Dorrington, 1981; Wang *et al.*, 1982). La 17 β HSD est aussi exprimée dans ce compartiment et permet la synthèse d'androstènediol et de testostérone

à partir de métabolites intermédiaires synthétisés dans le compartiment LH-sensible (Bjersing and Cartensen, 1964; Nimrod *et al.*, 1980; Moon and Duleba, 1982). Finalement, la progestérone est produite par les cellules de la granulosa, mais sa synthèse est régulée de façon complexe par l'action combinée de la FSH, des estrogènes et de la LH (induisant le CYP11A et la 3 β HSD) alors que sa synthèse, à partir de synthèse *de novo* de cholestérol, a lieu principalement dans ce compartiment à la fin de la folliculogénèse, par suite du pic pré-ovulatoire de LH (Boyd *et al.*, 1975; Hillier *et al.*, 1978; Dorrington and Armstrong, 1979; McNatty *et al.*, 1979; Jones and Hsueh, 1982).

En plus des gonadotrophines et des stéroïdes ovariens eux-mêmes, plusieurs hormones, stéroïdes et facteurs de croissance, comme les facteurs de croissance apparentés à l'insuline (IGFs), le facteur de croissance de l'épiderme (EGF), les catécholamines, l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH), les glucocorticoïdes, l'acétylcholine, la dopamine, la substance P, le peptide vasoactif intestinal (VIP) et l'acide γ -aminobutyrique (GABA), peuvent moduler localement la stéroïdogénèse (Gore-Langton and Armstrong, 1994). Certaines données suggèrent aussi l'implication de la 5-HT comme régulateur autocrine et paracrine de la stéroïdogénèse ovarienne, un aspect traité plus en détail dans la section 3.3.3.

1.5 Les cellules du cumulus

C'est au moment de la formation de l'antre que les cellules du cumulus entourant l'ovocyte se distinguent des cellules de la granulosa murales qui longent le mur folliculaire (Buccione *et al.*, 1990; Cortvrindt and Smitz, 2001). Leur destin est intimement lié à celui de l'ovocyte jusqu'à la dégradation du COC qui débute au moment de la fécondation et se termine peu avant la 1^{ère} division cellulaire de l'embryon.

Les cellules du cumulus sont en contact intime avec l'ovocyte via des projections cellulaires qui traversent la zone pellucide (Hertig and Adams, 1967; Anderson and Albertini, 1976). Par exemple, une étude chez l'humain a permis de démontrer que des prolongements des cellules du cumulus, particulièrement abondantes au cours du développement pré-antral du follicule, sont en contact non seulement avec la membrane

de l'ovocyte, mais plongent aussi profondément dans l'ovocyte et seraient en contact avec des organelles et la vésicule germinale de l'ovocyte (Motta *et al.*, 1994). De plus, ces projections possèdent des propriétés fonctionnelles similaires à celles des neurones, et pourraient donc jouer un rôle dans la capture et la relâche de facteurs paracrines à l'interface entre l'ovocyte et les cellules du cumulus. En effet, les projections transzonales contiennent des microtubules, qui transportent de manière bidirectionnelle des organites et sont régulés par l'environnement hormonal folliculaire suggérant une capacité de transport macromoléculaire régulable similaire à celle qu'on leur connaît dans les axones (Allworth and Albertini, 1993; Can and Albertini, 1997; Can *et al.*, 1997; Carabatsos *et al.*, 1998; Albertini *et al.*, 2001). Les cellules du cumulus expriment aussi la protéine de 25 kDa (SNAP-25), associée aux synaptosomes, qui permet l'échafaudage d'un complexe protéique contribuant à l'ancrage des vésicules à la membrane plasmique. Ceci laisse supposer la présence d'un mécanisme de relâche vésiculaire similaire à celui des synapses neuronales (Grosse *et al.*, 2000).

Les facteurs paracrines potentiellement sécrétés par les cellules du cumulus et pouvant influencer l'ovogénèse et la folliculogénèse sont nombreux et comprennent le ligand kit, le facteur de croissance du fibroblaste, l'IGF-I, l'IGF-II, l'EGF, le facteur inhibiteur de leucémie, le TGF- α , le TGF- β , le facteur de nécrose tumorale α , le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, la leptine, l'acétylcholine, la sérotonine et les catécholamines (Echternkamp *et al.*, 1990; Zolti *et al.*, 1990; Roberts and Skinner, 1991; Bodis *et al.*, 1992a; Artini *et al.*, 1994; Brannstrom *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1994; Mason *et al.*, 1994; Kamat *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 1995; Antczak *et al.*, 1997; Van Blerkom *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1997; Mayerhofer *et al.*, 1998; Mayerhofer *et al.*, 2003). Cependant, la fonction et le mécanisme d'action de la plupart de ces facteurs n'ont pas été identifiés avec certitude à ce jour.

Certaines des projections transzonales se terminent par des jonctions "gap" à la surface de l'ovocyte, permettant l'échange d'ions, de seconds messagers et de petits métabolites (<1 kDa) entre les cellules du cumulus et l'ovocyte (Kidder and Mhawi, 2002). L'unité fonctionnelle de la jonction "gap" est le connexon, organite cylindrique qui forme un canal membranaire, constitué d'un homo- ou hétéro-hexamère de protéines de la famille des connexines, chacune des connexines possédant des propriétés de perméabilité et de

régulation particulières (Swenson *et al.*, 1990; Bruzzone *et al.*, 1996a, b; Bevans *et al.*, 1998). L'interaction des extrémités des connexons de deux cellules adjacentes crée un canal intercellulaire qui permet l'échange de cellule à cellule. Dans l'ovocyte, la connexine 37 serait la seule exprimée par l'ovocyte; le "knockout" de cette connexine rend les souris infertiles avec arrêt de la folliculogénèse au stade pré-antral (Simon *et al.*, 1997). La connexine 37 pourrait interagir avec les connexines 32, 43 et 45 exprimées par les cellules du cumulus (Valdimarsson *et al.*, 1993; Okuma *et al.*, 1996; Alcolea *et al.*, 1999; Wright *et al.*, 2001).

Grâce aux jonctions "gap", les cellules du cumulus maintiennent l'ovocyte en arrêt méiotique, induisent sa maturation méiotique et supportent sa maturation cytoplasmique (Kidder and Mhawi, 2002; Tanghe *et al.*, 2002; Vanderhyden, 2002). Par exemple, il a été démontré que des acides aminés, des purines, l'AMPc et l'ion Ca^{2+} sont transférées des cellules du cumulus à l'ovocyte via les jonctions "gap" (Colonna and Mangia, 1983; Eppig *et al.*, 1985; Downs *et al.*, 1986; Kumar and Gilula, 1996; Webb *et al.*, 2002a, b). De plus, les ovocytes isolés métabolisent mal le glucose par rapport aux cellules du cumulus, lesquelles pourraient fournir des intermédiaires métaboliques facilement métabolisables, comme le pyruvate, à l'ovocyte via les jonctions "gap" (Biggers *et al.*, 1967; Heller and Schultz, 1980; Downs and Utecht, 1999).

Après le pic pré-ovulatoire de LH, les projections transzonales et donc l'influence des cellules du cumulus sur l'ovocyte sont diminuées, permettant la reprise de la méiose (Albertini and Rider, 1994). À ce moment, le *cumulus oophorus* entre en expansion en sécrétant une matrice de protéoglycans dont le carbohydrate majeur est l'acide hyaluronique (Ball *et al.*, 1982; Salustri *et al.*, 1999). À l'ovulation, les contacts entre l'ovocyte et les cellules du cumulus sont rompus, mais l'ovocyte et les cellules du cumulus sont emprisonnés dans la matrice de protéoglycans et seront ovulés sous la forme d'un complexe mature, alors que les cellules de granulosa murales se lutéinisent pour former le *corpus luteum* (Espey and Lipner, 1994; Niswender and Nett, 1994).

Après l'ovulation, le COC doit être capté par les cellules ciliées de l'infundibulum et descendre jusqu'à l'ampoule de l'oviducte où se déroulera la fécondation. Chez le hamster, les étapes de capture et de transport du COC sont facilitées par la présence d'un

complexe mature possédant une matrice extracellulaire normale (Mahi-Brown and Yanagimachi, 1983; Lam *et al.*, 2000).

1.6 L'ovocyte

L'ovocyte est le lien principal entre une génération et la suivante. En effet, l'ovocyte fournit l'essentiel des molécules et organites qui supportent les besoins nutritionnels, synthétiques, énergétiques et régulationnels nécessaires au développement du nouvel individu (Wassarman, 1994). Toutefois, l'ovocyte doit subir une maturation à la fois cytoplasmique et nucléaire, en parallèle avec le développement du follicule, pour être fécondable par le spermatozoïde.

1.6.1 Maturation cytoplasmique

Pendant leur phase de croissance, les ovocytes acquièrent une organisation cytoplasmique complexe qui dépend à la fois de la production de nouveaux gènes et d'organites et de la modification et la redistribution de ceux déjà présents. Par exemple, l'embryon héritera presque exclusivement des mitochondries de l'ovocyte, qui se multiplient et changent d'apparence, et le nombre de ribosomes augmente en accord avec la forte synthèse d'ARN ribosomiaux (ARNr) et protéique associée à cette période de croissance (Wassarman and Josefowicz, 1978; Schultz *et al.*, 1979). On observe aussi une migration des organites en périphérie de l'ovocyte comme le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, lequel se transforme de quelques saccules à de larges citernes dans le cortex de l'ovocyte, où il permettra l'exportation des glycoprotéines constituant la zone pellucide (Mehlmann *et al.*, 1995). La synthèse de la zone pellucide constitue une activité métabolique majeure de l'ovocyte à partir du stade de follicule primaire; elle produit trois glycoprotéines qui serviront de récepteur au spermatozoïde en plus de constituer un bloc à la polyspermie après la fécondation (Bleil and Wassarman, 1980a, b; Philpott *et al.*, 1987; Wassarman, 1988b). De plus, l'ovocyte montre une forte activité ARN polymérase et accumule des acides aminés, des ribonucléosides, et de nombreuses vésicules de réserve comme des granules de glycogène, des gouttelettes lipidiques et des corps cristallins qui serviront probablement

de sources d'énergie et de substrats après la fécondation (Schultz *et al.*, 1978; Picton *et al.*, 1998). Finalement, l'ovocyte mature est aussi une formidable réserve d'ARNm et de protéines qui seront nécessaires en cours de la folliculogénèse et pour subsister aux premières heures après la fécondation, alors que le génome de l'embryon n'est pas encore activé. Les mécanismes contrôlant la synthèse d'ARNm et leur traduction dans les ovocytes sont liés à la polyadénylation des ARNm et sont sélectifs et ordonnés de façon à ce que l'activation des ARNm en réserve puisse survenir à des étapes spécifiques de la maturation ovocytaire et du développement embryonnaire précoce (Bachvarova, 1992; Oh *et al.*, 2000).

1.6.2 Maturation nucléaire

Chez la majorité des mammifères, l'ovocyte arrête en prophase de la 1^{ère} méiose peu de temps après la naissance et reprendra sa maturation en réponse au pic pré-ovulatoire de LH qui interagit avec son récepteur exprimé à la surface des cellules de la granulosa (Park *et al.*, 2004). Au cours de la folliculogénèse pré-antrale, l'arrêt méiotique est maintenu par des facteurs inhérents à l'ovocyte et est relié à une faible activité de protéines régulatrices du cycle cellulaire comme la cycline B et la kinase cycline dépendante 1 (CDK1) (Eppig *et al.*, 2004). Cependant, une fois que l'ovocyte a complété sa croissance et qu'un antra commence à se former, l'arrêt méiotique dépend de l'environnement folliculaire. Ainsi, les ovocytes de follicules antraux reprennent spontanément la méiose lorsqu'ils sont isolés et mis en culture (Pincus and Enzmann, 1935; Eppig *et al.*, 2004). Cette observation a mené à l'hypothèse de la production d'un inhibiteur de la maturation méiotique par les cellules de la granulosa. Plusieurs candidats ont été suggérés pour remplir ce rôle, dont un peptide de moins de 20 kDa présent dans le liquide folliculaire de porc, ou l'hypoxanthine qui se trouve dans le liquide folliculaire à une concentration suffisante pour inhiber la maturation méiotique (Tsafiriri and Channing, 1975; Tsafiriri *et al.*, 1976; Downs *et al.*, 1985; Eppig *et al.*, 1985). Les recherches pour identifier avec certitude le (ou les) facteur qui maintient en arrêt méiotique l'ovocyte ont été pendant de longues années infructueuses, mais ont tout de même permis de révéler le rôle central joué par un haut niveau d'AMPc dans l'ovocyte (Conti *et al.*, 2002; Eppig *et al.*, 2004). Ce haut niveau d'AMPc ovocytaire serait

maintenu par l'activité de l'adénylate cyclase 3 et la faible activité de la phosphodiesterase 3A (PDE3A), et stimulerait l'activité de la PKA, causant la phosphorylation de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Bornslaeger *et al.*, 1986; Shitsukawa *et al.*, 2001; Horner *et al.*, 2003). Récemment, il a été démontré que l'activité constitutive d'une protéine G_s était nécessaire pour maintenir l'arrêt méiotique, puisque l'injection d'ovocytes avec un anticorps contre G_s ou d'un dominant négatif de G_s provoque la reprise de la méiose dans l'ovocyte à l'intérieur même du follicule (Mehlmann *et al.*, 2002; Kalinowski *et al.*, 2004). De plus, le récepteur activant cette protéine G_s a lui aussi été identifié. Il s'agit d'un RCPG orphelin nommé GPR3 et qui est exprimé à la fois dans l'ovocyte et les cellules de la granulosa, mais de façon plus abondante dans l'ovocyte (Mehlmann *et al.*, 2004). 82% des follicules antraux des souris "knockout" pour le GPR3 contiennent des ovocytes ayant repris leur méiose et l'injection de l'ARNm de GPR3 dans les ovocytes de follicules pré-antraux de souris "knockout" permet de restaurer l'arrêt méiotique (Mehlmann *et al.*, 2004).

Puisque l'environnement folliculaire maintient l'arrêt méiotique des ovocytes, le pic pré-ovulatoire de LH pourrait supprimer cette inhibition. Par exemple, l'action de la LH pourrait inhiber la sécrétion du ligand, encore inconnu, du récepteur GPR3, bloquer le transfert d'AMPc des cellules du cumulus à l'ovocyte en supprimant les jonctions "gap", ou provoquer une augmentation de l'activité de la PDE3A ovocytaire; augmentation d'activité observée lors de la reprise spontanée d'ovocytes de rat (Richard *et al.*, 2001; Conti *et al.*, 2002). Alternativement, la LH pourrait agir en stimulant une voie qui surpasserait l'inhibition folliculaire. Il a en effet été démontré que différents ligands comme la FSH, l'EGF, l'hormone de croissance (GH) ou le $TGF\beta$ provoquaient la reprise de la méiose chez des COCs cultivés *in vitro* en présence d'hypoxanthine (Dekel and Sherizly, 1985; Feng *et al.*, 1988; Apa *et al.*, 1994; Byskov *et al.*, 1997). Par ailleurs, la recherche d'un signal endogène régulant la reprise de la méiose a mené à l'identification d'un stérol activateur de la méiose (MAS), présent dans le liquide folliculaire, stimulant par les gonadotrophines et qui provoque la reprise de la méiose dans des COCs cultivés *in vitro* en présence d'hypoxanthine (Byskov *et al.*, 1995; Byskov *et al.*, 1997).

1.6.3 Influence paracrine de l'ovocyte sur le follicule

L'ovocyte est essentiel à la folliculogénèse puisque son absence ou son ablation empêche la formation et le développement du follicule (Eppig, 2001; Gilchrist *et al.*, 2004). Ainsi, l'ovocyte sécrète une variété de facteurs paracrines qui influencent la folliculogénèse en général et plus particulièrement les cellules du cumulus qui l'entourent. Par exemple, la transplantation d'ovocytes de follicules secondaires à des follicules primitifs double le rythme du développement du follicule et la différenciation des cellules de la granulosa, suggérant un rôle central de l'ovocyte dans l'orchestration et la coordination du développement folliculaire (Eppig *et al.*, 2002). De plus, la co-culture d'ovocytes dénudés avec des cellules de la granulosa ou du cumulus a permis de démontrer que l'ovocyte sécrète un (ou des) facteur mitogénique qui favorise la synthèse d'ADN et la prolifération de ces cellules en plus d'augmenter l'action mitogénique de régulateurs comme la FSH, l'IGF-I et les androgènes (Vanderhyden *et al.*, 1992; Armstrong *et al.*, 1996; Lanuza *et al.*, 1998; Gilchrist *et al.*, 2001; Hickey *et al.*, 2004).

L'ovocyte est aussi responsable du phénotype particulier des cellules du cumulus par rapport aux cellules de la granulosa. En effet, l'ablation chirurgicale de l'ovocyte d'un COC rétablit un phénotype de type granulosa de ses cellules en réduisant la capacité de synthèse d'ADN et en augmentant leur sécrétion de progestérone (Gilchrist *et al.*, 2004). De plus, l'ovocyte inhibe l'expression de l'ARNm du récepteur à LH et induit l'expression de gènes nécessaires au couplage métabolique particulier qui unit l'ovocyte et les cellules qui l'entourent (Eppig *et al.*, 1997; Eppig *et al.*, 1998; Sugiura *et al.*, 2005). Finalement, l'ovocyte régule l'expansion du cumulus et l'ovulation en stimulant l'expression de la hyaluronane synthétase-2 et de la cyclooxygénase 2 et en inhibant celle de l'activateur du plasminogène de type urokinase (Canipari *et al.*, 1995; Joyce *et al.*, 2001; Gilchrist *et al.*, 2004).

Parmi les facteurs sécrétés par l'ovocyte, des membres de la superfamille des TGF- β comme le facteur de différenciation et de croissance 9 (GDF-9), la protéine morphogénique de l'os 15 (BMP-15 ou GDF-9B) et la protéine morphogénique de l'os 6 (BMP-6) agissent comme régulateurs intra-folliculaires (Vanderhyden, 2002; Pangas and Matzuk, 2004; Juengel and McNatty, 2005).

Cette capacité de l'ovocyte à influencer son environnement cellulaire, via la sécrétion de facteurs paracrines, fluctue au cours de la folliculogénèse et serait elle-même régulée par des facteurs provenant des cellules somatiques dans un échange bidirectionnel complexe impliquant de nombreux facteurs.

Chapitre 2 : Introduction

L'activation ovocytaire

2.1 Hypothèse générale

À la fécondation chez les mammifères, le contact, puis la fusion du spermatozoïde fécondant avec l'ovocyte provoquent l'activation de l'ovocyte. Cette activation nécessite une forte augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , suivie d'une série d'oscillations de Ca^{2+} , dont la fréquence et l'amplitude varient en fonction de l'espèce et qui sont nécessaires au développement normal de l'embryon (Kline and Kline, 1992). Le premier pic de Ca^{2+} apparaît au point de contact entre les deux gamètes, de quelques secondes à quelques minutes après la fusion, et se propage, telle une vague, à travers tout l'ovocyte (Miyazaki *et al.*, 1986). Les oscillations subséquentes se propagent de sites de plus en plus diffus jusqu'à ce que, après plusieurs oscillations de Ca^{2+} , les augmentations de Ca^{2+} semblent être initiées de façon uniforme dans l'ovocyte (Miyazaki *et al.*, 1986). Ces oscillations de Ca^{2+} seraient nécessaires à la poursuite de la méiose et persisteraient jusqu'à la formation des pronuclei (Jones *et al.*, 1995). L'arrêt des oscillations calciques au moment de la formation des pronuclei serait dû à la séquestration, à l'intérieur de ceux-ci, d'une molécule permettant les oscillations calciques puisque l'injection de noyaux d'embryons 1 cellule ou 2 cellules dans des ovocytes de souris provoque des oscillations calciques semblables à celles observées à la fécondation (Kono *et al.*, 1995). Ces oscillations observées à la fécondation semblent influencer l'efficacité de l'activation et même le développement ultérieur de l'embryon.

Premièrement, l'inhibition complète des oscillations de Ca^{2+} à la fécondation bloque complètement l'activation. Ainsi, l'expulsion des granules corticaux, la formation du deuxième globule polaire et la formation des pronuclei n'ont pas lieu : l'ovocyte fécondé ne reprend donc pas sa maturation méiotique (Kline and Kline, 1992). L'étude de l'importance de ces oscillations de Ca^{2+} par l'activation parthénogénétique des ovocytes a aussi permis de mieux comprendre l'importance du nombre, de l'amplitude et de la fréquence des pics de Ca^{2+} . Ainsi, l'activation d'ovocytes par un simple pic de Ca^{2+} est possible, mais n'est pas complète puisqu'un faible taux d'ovocytes se rend jusqu'à la formation du pronucleus (Ozil and Swann, 1995). La même étude a permis de démontrer que l'activation causée par une série d'oscillations de Ca^{2+} est plus efficace,

puisqu'un plus grand nombre d'ovocytes montre la formation d'un pronucleus et plus rapidement (Ozil and Swann, 1995). Une autre étude, sur la variation de l'amplitude, à fréquence constante, a aussi démontré que la vitesse et le taux de formation du pronucleus étaient affectés positivement par une plus grande amplitude des oscillations (Vitullo and Ozil, 1992). Des agents comme le TPEN et le DTT ont été utilisés pour évaluer l'influence du nombre d'oscillations de Ca^{2+} sur le taux de réussite d'ovocytes de souris à former des pronuclei après la fécondation. Cette étude a permis de démontrer qu'un unique pic de Ca^{2+} était insuffisant pour provoquer la formation des pronuclei et que le pourcentage d'ovocytes avec pronuclei croît avec le nombre de pics observés (Lawrence *et al.*, 1998). Le nombre de ces oscillations aurait aussi un effet sur le temps nécessaire à la formation des pronuclei, la rupture de l'enveloppe nucléaire et le clivage au stade 2 cellules (Lawrence *et al.*, 1998).

En utilisant l'activation parthénogénétique d'ovocytes comme modèle, il a été démontré que les oscillations de Ca^{2+} observées après la fécondation ont un effet sur le développement embryonnaire. En effet, l'analyse de l'activation d'ovocytes de lapin par différentes doses de Ca^{2+} a permis de constater que la variation de la concentration et de la durée des pics calciques affectait positivement le taux d'activation, la configuration nucléaire, le taux de compaction et le taux de formation de blastocystes (Ozil, 1990). Chez la souris, différentes activations parthénogénétiques mènent à des proportions différentes de cellules formant la masse cellulaire interne versus le trophoctoderme dans les blastocystes (Bos-Mikich *et al.*, 1997). De plus, le taux d'implantation de ces embryons semble aussi varier en fonction du traitement (Bos-Mikich *et al.*, 1997).

L'ensemble de ces études confirme que les oscillations de Ca^{2+} observées dans les heures suivant la fécondation sont très importantes pour l'activation et le développement normal du nouvel embryon. Toutefois, une plus grande fréquence, amplitude et durée des oscillations n'est pas nécessairement bénéfique pour l'embryon. En effet, il a été démontré que la relâche excessive de Ca^{2+} peut nuire au développement en activant l'ovocyte de façon anormale (Gordo *et al.*, 2000). De la même manière, les oscillations de Ca^{2+} provoquées dans des ovocytes âgés orientent l'ovocyte vers la voie de l'apoptose plutôt que celle de l'activation (Gordo *et al.*, 2000). Les oscillations de Ca^{2+} contiendraient donc un message codé dans leur amplitude, fréquence et durée, qui peut

être décodé différemment en fonction du statut cellulaire (Dupont, 1998). Ce patron spécifique d'oscillations affecte aussi, à plus long terme, l'embryon en stimulant certains facteurs de transcription et en déterminant différents profils d'activation génétique importants pour le développement embryonnaire. Des exemples de décodage d'oscillations existent déjà dans le cas de cellules somatiques dont les facteurs de transcription ont des sensibilités différentes à l'amplitude, la durée et la fréquence des oscillations de Ca^{2+} (Dolmetsch *et al.*, 1997; Dolmetsch *et al.*, 1998).

Historiquement, l'accumulation d'information sur les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la génération de ces oscillations calciques a été dirigée vers trois principaux modèles : le spermatozoïde bombe à calcium, l'interaction ligand-récepteur et l'injection d'un facteur spermatique. Ces modèles ont servi de base pour l'élaboration d'expériences qui ont de recueillir un grand nombre de connaissances sur ce phénomène.

2.1.1 Spermatozoïde “bombe-conduit” à calcium

Le modèle du spermatozoïde “bombe-conduit” propose que le spermatozoïde contient une importante quantité de Ca^{2+} ou que, après la fusion des deux gamètes, des pores situées dans la membrane du spermatozoïde permettent l'entrée du Ca^{2+} dans le cytoplasme de l'ovocyte (Jaffe, 1991). Cet influx de Ca^{2+} provoque la surcharge des réserves intracellulaires de Ca^{2+} et sa libération, par un mécanisme de “relâche de Ca^{2+} induite par le Ca^{2+} ” (CICR). Cette hypothèse a toutefois été invalidée lorsqu'on a constaté que le 1^{er} influx de Ca^{2+} extracellulaire survient après le 1^{er} pic de Ca^{2+} (McGuinness *et al.*, 1996). De plus, l'introduction de Ca^{2+} dans l'ovocyte par injection (Igusa and Miyazaki, 1983) ou à l'aide de champs électriques (Ozil and Swann, 1995), qui cause un influx de Ca^{2+} , ne provoque qu'un pic et l'injection répétée de Ca^{2+} ne provoque pas une réponse semblable à celle observée lors de la fécondation (McGuinness *et al.*, 1996). Finalement, malgré la preuve récente de la nécessité de la fusion pour provoquer des oscillations de Ca^{2+} (Lawrence *et al.*, 1997), il a été démontré par imagerie du Ca^{2+} qu'il n'y a pas d'augmentation de Ca^{2+} dans la région correspondant au cytoplasme récemment fusionné du spermatozoïde avant une augmentation dans l'ovocyte (Jones *et al.*, 1998).

2.1.2 Activation ligand-récepteur

Le modèle de l'interaction ligand-récepteur propose que le spermatozoïde ou une molécule à sa surface agisse comme ligand envers un récepteur membranaire de l'ovocyte, pour activer subséquemment une phospholipase C (PLC) via une protéine G ou des tyrosines kinases, puis la voie de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃), menant à la libération de Ca²⁺ intracellulaire. Les techniques utilisées ont donc visé à démontrer le rôle de ces différentes molécules dans la génération d'oscillations de Ca²⁺.

L'implication possible d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) est illustrée par l'injection de GDPβS, qui bloque les oscillations de Ca²⁺ à la fécondation (Miyazaki *et al.*, 1993) et par l'injection répétée de GTPγS et l'activation d'un récepteur par la 5-HT, qui causent des oscillations de Ca²⁺ (Miyazaki *et al.*, 1990). La protéine G activée par ce récepteur activerait par la suite une PLCβ ou bien l'activation d'un récepteur mènerait à l'activation d'une voie des tyrosines kinases (la phosphorylation sur tyrosine de plusieurs protéines est augmentée après la fécondation) pour, ensuite, activer une PLCγ (Dupont *et al.*, 1996). Les données accumulées en faveur d'un rôle pour une PLC à la fécondation proviennent principalement du fait que l'U73122, un inhibiteur de PLC, bloque la relâche de Ca²⁺ et l'activation suivant la fécondation (Dupont *et al.*, 1996). De plus, 4 isoformes (β1, β3, γ1 et γ2) de l'enzyme sont présentes dans l'ovocyte (Dupont *et al.*, 1996; Mehlmann *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998). Ce modèle est aussi en accord avec un bon nombre de résultats ayant trait au second messenger IP₃, molécule produite par la conversion du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂) en IP₃ et diacylglycérol (DAG) par la PLC. En effet, la microinjection, dans l'ovocyte, de l'IP₃ ou de son analogue non-hydrolysable thio-IP₃ provoque la relâche de Ca²⁺ (Miyazaki *et al.*, 1993) et la micro-injection répétée de ces deux molécules cause des oscillations de Ca²⁺ (Fissore *et al.*, 1995). De plus, si l'on bloque le récepteur à l'IP₃ grâce à l'héparine ou à un anticorps dirigé contre le récepteur, les oscillations de Ca²⁺ et l'activation de l'ovocyte fécondé sont inhibées (Miyazaki *et al.*, 1993).

2.1.3 Facteur spermatique activateur

Ce dernier modèle est maintenant privilégié par une majorité de groupes de recherche. En effet, il tient compte des données accumulées en faveur des autres modèles et de nouvelles démonstrations. Aussi, le fait que la fusion des deux gamètes soit nécessaire et que le contact entre les deux gamètes soit dispensable (dans le cas de l'injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI)) pour l'apparition des oscillations calciques est compatible avec le modèle du facteur spermatique. Les données sur l'utilisation de l'U73122 et sur l'IP₃ sont aussi très pertinentes, si l'on envisage que le facteur spermatique interviendrait dans une cascade en modulant le niveau d'IP₃. Il a aussi été démontré que l'injection d'un extrait spermatique de souris, de porc, d'humain et de hamster dans un ovocyte provoque une série d'oscillations calciques très semblables à celles observées lors de la fécondation (Swann, 1990; Parrington *et al.*, 1996; Palermo *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997). De plus, une variation dans la dose de ce facteur spermatique provoque une variation dans la fréquence des oscillations observées (Swann, 1990). Ce facteur spermatique provoque aussi, tout comme à la fécondation, une sensibilisation de l'ovocyte à la CICR ; mécanisme probablement très important dans la génération des oscillations de Ca²⁺ (Swann and Ozil, 1994).

En fait, la donnée manquante principale pour confirmer ce modèle est l'identification du facteur spermatique. Quelques candidats ont été proposés et les études visant à identifier ce facteur ont permis d'en déterminer quelques caractéristiques importantes. Ce facteur semble être de nature protéique, puisqu'il est sensible à la chaleur et à la trypsine (Swann, 1990; Wu *et al.*, 1997). Il est d'un poids moléculaire de 29-68 kDa (Swann, 1990) et peut être séparé partiellement par chromatographie (Wu *et al.*, 1998). Son expression semble restreinte au spermatozoïde, puisque l'injection d'extraits protéiques d'autres tissus ne provoque pas les oscillations calciques (Wu *et al.*, 1997).

Le spermatozoïde fécondant provoquerait donc des oscillations de Ca²⁺ en injectant une ou des protéines, plus ou moins solubles au départ, dans le cytoplasme de l'ovocyte. Ce facteur spermatique activateur provoque la relâche de Ca²⁺ des réserves internes de l'ovocyte et le maintien de ces oscillations calciques dépend d'influx de Ca²⁺ extracellulaire (Swann, 1994). La libération de Ca²⁺ intracellulaire nécessite l'ouverture

des canaux sensibles à l'IP₃; même si l'on ignore toujours si le facteur spermatique agirait pour produire de l'IP₃ ou sur le récepteur lui-même (Swann and Lai, 1997). Le facteur spermatique provoquerait aussi une sensibilisation de l'ovocyte à la CICR. Cette caractéristique des ovocytes post-fécondation serait très importante pour le maintien des oscillations de Ca²⁺ et impliquerait une modification de la sensibilité des récepteurs à IP₃ de l'ovocyte. Ainsi, une fois la CICR sensibilisé jusqu'à un certain seuil, les oscillations se régénéreraient d'elles-mêmes et ce, à une concentration basale de Ca²⁺ (Parrington *et al.*, 1998). Ainsi, l'effet d'une vague de Ca²⁺ suivie d'oscillations initiées en des endroits de plus en plus diffus, serait dû à la libération du facteur spermatique (provoquant initialement une vague rapide de Ca²⁺ à partir du point de fusion), suivi de la diffusion plus lente du facteur spermatique responsable de cette sensibilisation à la CICR à travers l'ovocyte (provoquant une initiation de plus en plus diffuse des augmentations de Ca²⁺).

2.2 Facteurs spermatiques potentiels

L'accumulation de preuves en faveur de l'hypothèse du facteur activateur spermatique a mené à une course à la purification et à l'identification de ce ou ces facteurs spermatiques activateurs. En cours d'étude, deux candidats crédibles ont été considérés: les protéines oscilline et tr-kit. Un autre candidat vraisemblable, la phospholipase C zeta (PLCζ), n'a pas été examinée lors de nos travaux. Toutefois, le rôle potentiel de la PLCζ sera discuté dans la section 6.3 étant donné les différents travaux soulignant son importance dans l'activation des ovocytes de mammifères.

2.2.1 L'oscilline

L'historique de ce candidat activateur est relativement simple puisqu'une seule publication regroupe l'ensemble des travaux qui ont mené à son identification et sa caractérisation (Parrington *et al.*, 1996). Les auteurs ont tout d'abord préparé un extrait cytosolique des protéines de spermatozoïdes de hamster. Ensuite, ils ont utilisé successivement des colonnes chromatographiques pour séparer les protéines cytosoliques extraites en différentes fractions. L'activité oscillogène de ces différentes fractions sur le niveau de Ca²⁺ intracellulaire a ensuite été évaluée par micro-injection

dans des ovocytes de souris. Ce protocole expérimental a permis d'identifier une protéine d'environ 33 kDa co-migrant avec l'activité oscillogène des fractions purifiées. Aucune autre protéine ne co-migrerait avec l'activité oscillogène, suggérant que cette protéine de 33 kDa était le principal composant du facteur spermatique activateur. Cette protéine ne semble pas être une protéine G puisqu'une variété d'anticorps dirigés contre des protéines G de mammifère ne la reconnaissent pas. De plus, un anticorps monoclonal préparé contre cette protéine a permis de confirmer son expression dans le spermatozoïde et non pas dans des extraits de foie ou de cerveau, en accord avec une absence d'activité oscillogène dans les extraits protéiques de ces deux tissus (Swann, 1990). Aussi, le pI d'environ 6 de cette protéine de 33 kDa correspond à celui des fractions démontrant une activité oscillogène.

L'analyse de la séquence amino-terminale de la protéine de 33 kDa et le criblage d'une banque d'ADNc de testicule de hamster a permis d'en déterminer la séquence. Cette séquence code pour un polypeptide de 289 acides aminés avec une masse moléculaire prédite de 32610 et un pI de 6.4 correspondant à la caractérisation biochimique de la protéine extraite des spermatozoïdes de hamster. Cette protéine montre une homologie de 53% avec une glucosamine-6-phosphate isomérase isolée chez *Escherichia coli*.

Finalement, une étude d'immunofluorescence indirecte avec un anticorps spécifique a permis de localiser la protéine dans la région équatoriale interne des spermatozoïdes de hamster, porc et humain. Par suite de cette démonstration de l'activité oscillogène de la protéine, les auteurs ont proposé de la nommer oscilline (Parrington *et al.*, 1996).

L'oscilline possède plusieurs caractéristiques essentielles à un facteur spermatique injecté. Son pI, sa taille et sa nature peptidique correspondent aux caractéristiques biochimiques identifiées précédemment. Son expression, restreinte au spermatozoïde, et sa localisation, dans la partie équatoriale interne, correspondent aussi à des caractéristiques compatibles avec les propriétés d'un facteur spermatique injecté. Sa présence chez le hamster, le porc et l'humain, ainsi que sa capacité de stimuler des ovocytes de souris, correspondent à l'universalité d'un tel mécanisme chez les mammifères. Finalement, l'activité oscillogène sur le niveau de Ca^{2+} intracellulaire semble confirmer son importance dans le processus d'activation ovocytaire et la

justification de son nom, malgré l'absence complète d'explications sur le mécanisme moléculaire impliqué dans la genèse des oscillations.

2.2.2 Tr-kit

La protéine tr-kit est une version tronquée du récepteur tyrosine kinase c-kit, récepteur impliqué dans l'hématopoïèse, la mélanogénèse et la gamétogénèse pendant le développement et chez l'animal adulte (Ashman, 1999). Cette version tronquée du récepteur a été identifiée chez la souris, est codée par un transcrit de 3.2 kb, avec un promoteur alternatif se trouvant à l'intérieur du 16^{ième} intron du gène codant pour c-kit (Rossi *et al.*, 1992). La séquence codante prédit une protéine de 202 acides aminés, contenant 12 acides aminés spécifiques à tr-kit et 190 acides aminés contenant la seconde boîte du domaine tyrosine kinase (site catalytique phosphotransférase) et le site d'autophosphorylation dans le domaine intracellulaire, mais excluant le domaines extracellulaires et transmembranaires, la première boîte du domaine tyrosine kinase (site de liaison de l'ATP) et la région entre les deux boîtes tyrosine kinase (Rossi *et al.*, 1992).

La protéine elle-même est détectée dans les spermatides en élongation et les spermatozoïdes et est localisée par immunofluorescence indirecte dans la région de la tête, de la pièce intermédiaire et de la goutte cytoplasmique, mais pas dans la région de l'acrosome (Albanesi *et al.*, 1996; Sette *et al.*, 1997).

Pour ce qui est du rôle de tr-kit dans l'activation ovocytaire, l'injection d'extraits de cellules COS transfectées avec une tr-kit recombinante provoque la formation de pronuclei dans 70% des ovocytes de souris injectés, dont 90-95% se rendront jusqu'au stade 2 cellules lorsque cultivés *in vitro*, alors que l'incubation des ovocytes dans du BAPTA-AM (chélateur de Ca^{2+} intracellulaire) inhibe ces effets, suggérant une implication du Ca^{2+} dans le mécanisme d'activation de tr-kit (Sette *et al.*, 1997). De la même façon, l'injection de l'ARNm de tr-kit dans des ovocytes provoque la formation de pronuclei dans 56% des ovocytes injectés et les ovocytes injectés avec l'ARNm de tr-kit ou des extraits de cellules COS transfectées avec tr-kit montrent une exocytose des granules corticaux, suggérant encore une fois l'implication du Ca^{2+} intracellulaire (Sette *et al.*, 1997). L'injection de 0.2-0.4 équivalents/spermatozoïde de tr-kit suffit à causer

l'activation de 70% des ovocytes injectés et le temps requis pour les différentes étapes de cette activation est semblable à celui observé normalement (Sette *et al.*, 1998).

Pour ce qui est du mécanisme d'activation, l'implication d'une PLC de l'ovocyte est suggérée par l'inhibition par l'U73122 de l'activation causée par tr-kit (Sette *et al.*, 1997). L'implication d'une PLC de l'ovocyte est aussi suggérée par l'inhibition de l'activation causée par tr-kit lors de la co-injection d'extraits de cellules COS transfectées avec le domaine SH3 de la PLC γ 1 ou un anticorps dirigé contre cette partie (Sette *et al.*, 1998). Aussi, la co-transfection de tr-kit et de la PLC γ 1 dans des cellules COS cause une forte augmentation de la production de DAG et d'inositol phosphate (Sette *et al.*, 1998). Finalement, la co-transfection de tr-kit et de la PLC γ 1 dans des cellules COS augmente le niveau de phosphorylation de la PLC γ 1, mais pas le niveau général de phosphorylation d'autres protéines (Sette *et al.*, 1998).

Le candidat tr-kit possède plusieurs caractéristiques essentielles à un facteur spermatique injecté. La protéine tr-kit est exprimée dans les spermatides et les spermatozoïdes seulement et sa localisation, dans le cytoplasme résiduel et la pièce intermédiaire, correspond aux caractéristiques d'un facteur spermatique injecté. Aussi, sa capacité d'activer les ovocytes de souris selon un mécanisme dépendant du Ca²⁺ et de provoquer différents signes physiologiques de cette activation correspond aux propriétés attendues d'un tel facteur. Finalement, le début de caractérisation du mécanisme moléculaire et l'implication d'une PLC et de l'inositol phosphate sont compatibles avec les données obtenues jusqu'à maintenant malgré l'absence de mesures du Ca²⁺.

Chapitre 3 : Introduction

La sérotonine

3.1 Origine historique et évolutive de la sérotonine et de ses récepteurs

Dans le monde vivant, seuls quelques acides aminés sont utilisés pour devenir des signaux par transformation chimique de la molécule. En fait, trois acides aminés servent de base moléculaire aux systèmes de signalisation aminergique, soit la tyrosine, l'histidine et le tryptophane. La tyrosine sert de structure de base à la formation de la thyroxine, de la triiodothyronine, de l'octopamine, de la dopamine, de la noradrénaline et de l'adrénaline. L'histidine sert de base structurelle à l'histamine. Finalement, le tryptophane et son noyau indole sert de structure de base à la sérotonine et à la mélatonine. La sérotonine a été initialement purifiée et caractérisée en fonction de sa propriété "tonique" et vasoconstrictrice à partir de sérum de boeuf d'où provient son nom (Rapport *et al.*, 1948). Aujourd'hui, la 5-HT est considérée comme une neurohormone, étant donné sa fonction de neurotransmetteur dans le système nerveux central et son rôle hormonal en périphérie et ce, à de multiples niveaux. Son origine remonte à plusieurs centaines de millions d'années puisqu'on peut la détecter chez un organisme tel que le protozoaire *Tetrahymena pyriformis* (Essman, 1987). Chez cet unicellulaire, le contact avec la 5-HT provoque la transmission, sur plusieurs centaines de générations, d'une "empreinte hormonale" spécifique qui augmente la sensibilité et la spécificité à la 5-HT de l'organisme exposé (Csaba *et al.*, 1980). De plus, la 5-HT affecte différentes fonctions physiologiques de l'organisme comme sa synthèse d'ARN (Csaba and Ubornyak, 1981) ou son activité phagocytaire (Csaba, 1993), suggérant donc une capacité de reconnaissance de type signal-récepteur chez cet organisme.

L'action de la 5-HT est transmise par une famille de récepteurs spécifiques et dont les 1^{er} membres ont été initialement décrits il y a près de 50 ans grâce à l'étude de sites ayant des fonctions physiologiques et propriétés pharmacologiques différentes (Gaddum and Picarelli, 1957). Par la suite, les techniques de biologie moléculaire ont permis d'identifier une grande variété de récepteurs à 5-HT.

La comparaison des séquences de ces récepteurs à 5-HT permet d'en analyser l'ancienneté, l'origine évolutive et de déduire certaines des propriétés. Cette analyse, qui permet de générer des arbres phylogénétiques de familles de gènes, repose sur

l'hypothèse que les gènes de la superfamille des RCPG ont une structure secondaire conservée, un rythme relativement constant de mutation dans leur séquence (environ 1% de différence par 10 millions d'années) et que plusieurs de ces gènes ne contiennent pas d'introns (Fryxell, 1995).

Ainsi, une analyse par Peroutka et Howell rapporte qu'un récepteur à 5-HT "primordial" se serait différencié en récepteur 5-HT₁-primitif, 5-HT₂ et 5-HT₆ il y a environ 800 millions d'années (Peroutka and Howell, 1994). Par la suite, il y a environ 700 millions d'années, la famille 5-HT₁-primitif aurait donnée lieu aux familles de récepteurs 5-HT₅, 5-HT₇ et 5-HT₁ précédant la séparation entre les vertébrés et les invertébrés, laquelle aurait eu lieu il y a 600 millions d'années. Ensuite, à 500 millions d'années, seraient apparues les différents sous-types de récepteur 5-HT₁ et de récepteur 5-HT₂. Finalement, il y a 300 millions d'années, les différentes formes de récepteurs 5-HT₃ seraient apparues et ce, bien avant la séparation entre les différents mammifères (il y a de cela 90 millions d'années environ). Ces mêmes auteurs suggèrent que les récepteurs muscariniques, dopaminergiques, α -adrénergiques et β -adrénergiques, ressemblant davantage aux récepteurs 5-HT₁ qu'aux récepteurs 5-HT₂ et 5-HT₆, auraient, eux aussi, pu évoluer à partir d'un récepteur à 5-HT "primordial" (Peroutka and Howell, 1994). Cette analyse n'inclut cependant pas les récepteurs 5-HT₃, qui auraient une origine évolutive différente puisque ce ne sont pas des RCPG, ni le récepteur 5-HT₄, qui n'était pas encore séquencé à l'époque, mais illustre l'ancienneté, l'importance et la complexité des récepteurs à 5-HT d'un point de vue évolutif.

3.2 Les membres d'un système sérotoninergique

La sérotonine agit comme molécule-signal et est accompagnée d'une variété de protéines permettant sa synthèse, la transduction de son signal, son internalisation et sa dégradation. L'ensemble de ces molécules forment un système sérotoninergique complet. La synthèse de sérotonine a lieu en deux étapes, respectivement catalysées par la tryptophane hydroxylase et la décarboxylase des acides aminés L aromatiques. Après sa libération, la 5-HT peut activer une variété de récepteurs possédant différentes propriétés pharmacologiques, capacités de transductions et sites d'expression, qui

rendent compte de la diversité de ses fonctions. Par la suite, la 5-HT peut être recaptée et internalisée par un transporteur membranaire spécifique qui permet l'arrêt de l'exposition des récepteurs à la 5-HT et son recyclage vers un nouveau cycle de sécrétion ou sa dégradation par la monoamine oxydase (MAO) exprimée à l'intérieur de la cellule. Cette section résumera donc les principales caractéristiques de chacun de ces membres qui permettent à la 5-HT la complexité de son action.

3.2.1 Les enzymes de synthèse de la sérotonine

La première étape dans la synthèse de la 5-HT est le transport à l'intérieur de la cellule de l'acide aminé tryptophane. La source première de cet acide aminé est alimentaire et son transport à l'intérieur de la cellule est régulé par un transporteur d'acide aminé qui permet aussi l'internalisation d'acides aminés neutres comme la leucine, l'isoleucine, la valine et la phénylalanine (Martinez *et al.*, 2001). Ainsi, dans le cerveau par exemple, la synthèse de 5-HT dépend du niveau de tryptophane dans la cellule nerveuse qui, lui-même, dépend de la concentration de tryptophane dans le sang. Dans le cas d'un régime alimentaire faible en tryptophane et puisque le même transporteur permet l'internalisation du tryptophane et d'autres acides aminés neutres, la compétition entre ceux-ci peut induire une baisse du niveau de 5-HT dans le cerveau et ainsi modifier certains comportements associés à la 5-HT. Ceci a déjà été démontré, à tout le moins à court terme, chez des modèles animaux et chez l'humain (Reilly *et al.*, 1997). Une fois internalisé, le tryptophane peut subir une première étape d'hydroxylation par la TPH. Cette hydroxylation est l'étape limitante de la synthèse de la 5-HT et on retrouve la TPH uniquement dans les cellules qui synthétisent la 5-HT. Ensuite, le 5-hydroxytryptophane (5-HTP) sera décarboxylé par la décarboxylase d'acides aminés L aromatiques (DCAA), qui ne sert pas exclusivement à la synthèse de 5-HT. Cette enzyme peut aussi être utilisée pour la synthèse de la dopamine, par exemple, et n'est donc pas un marqueur spécifique de la synthèse de la 5-HT.

3.2.1.1 Les tryptophane hydroxylase 1 et 2

La TPH catalyse la première et limitante étape de la synthèse de 5-HT et fait partie, avec la phénylalanine hydroxylase et la tyrosine hydroxylase, de la famille des

hydroxylases aromatiques dépendantes de la tétrahydroptérine. Ces enzymes sont toutes des homotétramères et comportent trois régions distinctes (Fitzpatrick, 2003). Le domaine N-terminal possède des propriétés de régulation et se termine à la proline 106 de la séquence humaine (Mockus and Vrana, 1998) correspondant à la proline 109 de la TPH1 murine. Le domaine catalytique est composé de 296 acides aminés et suivi d'une extrémité C-terminale composée de 43 résidus permettant la tétramérisation. Le mécanisme de réaction de la TPH est relativement bien élucidé et nécessite un ion ferreux, la tétrahydroptérine et une molécule d'oxygène par sous-unité catalytique (Fitzpatrick, 2003).

Puisque la TPH est l'enzyme limitante de la synthèse de la 5-HT, une modulation de son expression ou de son activité a un impact direct sur le niveau de 5-HT et cette modulation peut avoir lieu à plusieurs niveaux. Ainsi, la transcription du gène de la TPH1 transfecté dans des pinéaloctes en culture est augmenté par l'AMPc (Boularand *et al.*, 1995). Aussi, l'activité de la TPH est régulable puisqu'elle peut être phosphorylée et activée par la PKA et la CAM kinase II (Hamon *et al.*, 1978; Kuhn *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2000). Une fois phosphorylée, la TPH peut, en plus, être liée et activée par un des membres de la famille protéique 14-3-3 qui permet la formation d'échafaudages moléculaires complexes (Isobe *et al.*, 1991; Mackintosh, 2004).

Jusqu'à tout récemment, il était généralement admis que la TPH était codé par un seul et même gène et ce, dans les quatre structures principales où elle était exprimée soit la glande pinéale, les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé, les cellules entérochromaffines et les neurones myentériques de l'intestin (Lovenberg *et al.*, 1967; Legay *et al.*, 1983). Toutefois, l'étude du "knockout" de la TPH a permis de démontrer un niveau normal de 5-HT dans le cerveau des souris mutantes, mais un niveau de 5-HT presque marginal en périphérie (Walther *et al.*, 2003a). Ce fait s'explique par la découverte d'un second gène codant pour la TPH2, qui est exprimée dans le cerveau mais est absente du duodénum, alors que l'opposé est observé dans le cas de la TPH1 (Walther *et al.*, 2003a). Cette seconde isoforme, de 488 acides aminés, est identique à 68% à la première isoforme et à 80% dans la région catalytique.

Récemment, l'étude plus approfondie du "knockout" du gène de la TPH1 et son remplacement par le gène de la β -galactosidase a permis de clarifier les sites

d'expression de chacune des enzymes et de mieux comprendre l'importance de la TPH1 (Côté *et al.*, 2003). Premièrement, le niveau de 5-HT dans différents tissus de la souris mutante montre qu'il est légèrement plus bas dans le tronc cérébral, mais qu'il est presque inexistant dans la glande pinéale, l'intestin et le sang (seulement 8% du niveau de la souris sauvage). Dans l'intestin, la faible quantité de 5-HT détectée semble provenir des neurones myentériques qui sont concentrés, tout comme la 5-HT restante, dans le duodénum. De plus, l'étude par hybridation *in situ* et RT-PCR a permis de démontrer l'expression de la TPH2 dans le cerveau et le plexus myentérique alors que l'expression de la TPH1 est restreinte aux cellules entérochromaffines et aux pinéalocytes (Côté *et al.*, 2003). Cette expression de la TPH2, dans les cellules neuronales, et l'expression de la TPH1, dans les autres types cellulaires périphériques ayant la capacité de synthétiser la 5-HT a aussi été confirmée chez l'humain et le rat (Patel *et al.*, 2004; Zill *et al.*, 2004). Les conséquences phénotypiques du "knockout" de la TPH1 et de la baisse de 5-HT périphérique résultante ont aussi été étudiées (Côté *et al.*, 2003; Walther *et al.*, 2003b). Ainsi, les souris mutantes ont de la difficulté à respirer, un temps de saignement prolongé et montrent rapidement des signes de fatigue. De plus, le cœur des souris mutantes était en moyenne 26% plus gros que celui des souris sauvages, malgré le fait que le ratio cœur-corps n'était pas augmenté et que le cœur ne montrait pas d'anomalies apparentes (Côté *et al.*, 2003). Les auteurs de ces études n'ont pas noté d'effet particulier sur la fonction reproductrice, puisque les souris sont viables et fertiles avec une distribution mendélienne de leur descendance (Côté *et al.*, 2003). Finalement, l'étude du "knockout" de la TPH1 a permis d'identifier un nouveau mécanisme d'action de la 5-HT jusqu'à alors insoupçonné : l'activation, indépendante du GTP, de GTPases cytosoliques des plaquettes sanguines par la formation d'un lien covalent entre les GTPases et la 5-HT (Walther *et al.*, 2003b). Cette fonction de la 5-HT serait dépendante de l'internalisation de la 5-HT par le transporteur à 5-HT, de la transamidation de la 5-HT à un résidu glutamine de la GTPase par une transglutaminase et serait indépendante des récepteurs à 5-HT (Walther *et al.*, 2003b).

3.2.1.2 La décarboxylase des acides aminés L aromatiques

L'importance de la DCAA a été longtemps négligée puisque cette enzyme était considérée comme non spécifique, non limitante et non modulable au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel. En effet, la DCAA peut décarboxyler une variété d'acides aminés aromatiques et leurs dérivés comme la L-DOPA, le 5-HTP, la tyrosine, la phénylalanine et le tryptophane et n'est donc pas associée à la synthèse d'une seule molécule (Zhu and Juorio, 1995). De plus, son expression a été observée dans une variété de types cellulaires et tissus, comme les neurones catécholaminergiques et sérotoninergiques, les cellules gliales, la glande pinéale, la glande surrénale, le pancréas, le rein et le foie (Christenson *et al.*, 1970; Bouchard and Roberge, 1979; Lindstrom and Sehlin, 1983; Bowsher and Henry, 1986; Dominici *et al.*, 1987; Li *et al.*, 1992; Eaton *et al.*, 1993). On considère généralement que cette étape de synthèse est non limitante, puisque le Km calculé de la DCAA est largement supérieur à la concentration endogène de l'acide aminé aromatique correspondant ce qui suggère que l'enzyme n'est pas saturée *in vivo* (Bowsher and Henry, 1986). Le cDNA de la DCAA de plusieurs espèces a été cloné et la DCAA murine comprend 480 acides aminés pour une masse moléculaire prédite de 53.9 kDa. Ce gène existerait en une seule copie dans le génome des mammifères, mais il pourrait exister différentes isoformes de DCAA, dans différents tissus, produites par des promoteurs alternatifs ou par épissage alternatif (Berry *et al.*, 1996).

3.2.2 Les récepteurs à sérotonine

Chez les mammifères, les récepteurs à 5-HT forment sept familles de récepteurs et six de ces familles comprennent treize gènes codant pour des RCPG. Les récepteurs à 5-HT couplés aux protéines G ont le profil habituel de ces récepteurs, avec sept passages transmembranaires connectés par trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires. La 7^{ième} famille comprend plusieurs gènes codant pour la sous-unité d'un récepteur-canal à ions. Plusieurs de ces récepteurs subissent des modifications post-génomiques, comme l'épissage alternatif, qui créent une variété encore plus grande de récepteurs générant ainsi un minimum de trente récepteurs à 5-HT différents.

Nous nous attarderons sur une description détaillée des propriétés pharmacologiques, sites d'expression, similarités de séquence, effets du "knockout" d'un récepteur et des voies de transduction principales qui caractérisent chacune de ces familles, avec un intérêt particulier pour les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT₇. Pour ce qui est des fonctions physiologiques présumées et voies de transduction moins classiques des récepteurs à 5-HT, d'excellents articles de revue ont été publiés récemment (Barnes and Sharp, 1999; Raymond *et al.*, 2001). Les principales propriétés de chacun des sous-types de récepteur sont résumées dans le tableau 3.1 (page 42).

3.2.2.1 La famille 5-HT₁

La famille 5-HT₁ forme la plus grande famille de récepteurs à 5-HT et est composée des récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} et 5-HT_{1F}. Ces récepteurs ont tous été clonés chez la souris, sauf le récepteur 5-HT_{1E} qui ne serait pas présent dans le génome de cette espèce (Maroteaux *et al.*, 1992; Wilkie *et al.*, 1993; Guptan *et al.*, 1997; Bai *et al.*, 2004). Ces récepteurs sont tous des RCPG, sont codés par des gènes sans introns, ont entre 365 et 422 acides aminés et ont une similarité de séquence entre eux de 40 à 60%. Ils sont tous couplés préférentiellement à une inhibition de l'adénylate cyclase via les protéines G_{ai} ou G_{ao}, mais l'activation d'autres voies a été rapportée, surtout en ce qui concerne le récepteur 5-HT_{1A}, l'un des mieux étudiés (Lanfumeey and Hamon, 2004). Les membres de cette famille de récepteurs ne possèdent pas un profil pharmacologique commun, exception faite de la forte affinité de l'agoniste 5-CT dans le cas des récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} et 5-HT_{1D}.

Le récepteur 5-HT_{1A} est exprimé principalement dans le système nerveux central (SNC), mais son expression a aussi été rapportée dans les neurones de l'intestin et du pancréas (Kirchgessner *et al.*, 1996). Dans le SNC, le récepteur 5-HT_{1A} agit à la fois en pré-et post-synaptique par rapport aux neurones 5-HT. Il peut être distingué des autres récepteurs à 5-HT de par sa forte affinité pour l'agoniste 8-OH DPAT et pour l'antagoniste WAY100635 (Lanfumeey and Hamon, 2004). L'étude de la souris "knockout" pour le récepteur 5-HT_{1A} suggère que ce récepteur pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'état émotionnel lié à l'anxiété et à la dépression, mais les souris

Famille	Sous-types et isoformes	Voie de transduction principale	Disponibilité du "knockout"	Expression en périphérie
5-HT ₁	A, B, C, D, e, F	Gi/o ↓AMPc	1A 1B	1A : intestin, pancréas 1B : lymphocytes, système vasculaire
5-HT ₂	A, B, C	Gq, PLC ↑Ca ²⁺	2B 2C	2A : os, système vasculaire, poumon, tractus gastro-intestinal, rein, plaquettes, rétine, poumon, lymphocytes, utérus, ovaire 2B : lymphocytes, système vasculaire, estomac, os, intestin, poumon 2C : poumon
5-HT ₃	A, B, C, D, E	Récepteur canal à cations	3A	3A : intestin
5-HT ₄	isoformes a, b, c, d, e, f, g, n, hb	Gs ↑AMPc	Oui	tractus gastro-intestinal, cœur, glande surrénale, vessie
5-HT ₅	a, b	Gi/o ↓AMPc	-	a : ganglions, corps carotide
5-HT ₆	-	Gs ↑AMPc	-	-
5-HT ₇	isoformes a, b, c, d	Gs ↑AMPc	Oui	système vasculaire, rein, tractus gastro-intestinal, glande surrénale, lymphocytes, ovaire, oviducte

Tableau 3.1: Principales caractéristiques des familles de récepteurs à 5-HT.

sont fertiles et le croisement de souris hétérozygotes montre un ratio mendélien normal (Heisler *et al.*, 1998; Parks *et al.*, 1998; Ramboz *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 1999).

Le récepteur 5-HT_{1B} est aussi retrouvé en pré- et post-synaptique par rapport aux neurones 5-HT dans le SNC, mais aussi dans les artères cérébrales, les tissus vasculaires périphériques et les lymphocytes (Stefulj *et al.*, 2000; Lanfumey and Hamon, 2004). La souris “knockout” pour le récepteur 5-HT_{1B} montre une distribution mendélienne de sa descendance et est plus réactive et agressive que la souris sauvage, suggérant une régulation de l’état émotionnel (Saudou *et al.*, 1994; Zhuang *et al.*, 1999). La pharmacologie de ce récepteur est très semblable à celle du récepteur 5-HT_{1D}, avec des agonistes comme le sumatriptan, le L-694247, le RU 24969 et des antagonistes comme la méthiothépine, le GR 127935 et le GR 125743, qui ont une forte affinité pour les deux sous-types (Skingle *et al.*, 1995; Pauwels *et al.*, 1996; Lanfumey and Hamon, 2004). Cependant, ces deux sous-types peuvent être différenciés entre eux par l’utilisation d’antagonistes comme le SB-224289 et le SB-216641, qui sont sélectifs pour le 5-HT_{1B}, ou le BRL-15572, la kétansérine et la ritansérine qui ont une affinité plus forte pour le 5-HT_{1D} (Pauwels *et al.*, 1996; Price *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 1997). Dans le SNC, une étude de l’ARNm du récepteur 5-HT_{1D} montre une faible expression dans les neurones contenant la 5-HT ou d’autres neurotransmetteurs (Bruinvels *et al.*, 1994).

Il existe très peu de données concernant le profil pharmacologique, l’expression et la fonction des récepteurs 5-HT_{1E} et 5-HT_{1F}, exception faite de deux agonistes qui montrent une certaine sélectivité pour le récepteur 5-HT_{1F} : le LY344864 et le Y334370 (Barnes and Sharp, 1999). L’ARNm du récepteur 5-HT_{1F} a été détecté dans le cerveau et les lymphocytes, mais ne serait pas détectable dans le rein, le foie, la rate, le coeur, le pancréas et le testicule chez l’humain (Stefulj *et al.*, 2000; Lanfumey and Hamon, 2004).

3.2.2.2 La famille 5-HT₂

La famille de récepteurs 5-HT₂ est composée de récepteurs codés par trois gènes. Les récepteurs 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C} ont été clonés chez différentes espèces, soit le hamster chinois, l’humain, le singe, la souris, le porc et le rat pour le récepteur 5-HT_{2A} et chez la souris, le rat et l’humain pour les récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C} (Julius *et al.*, 1988; Pritchett *et al.*, 1988; Chambard *et al.*, 1990; Julius *et al.*, 1990; Saltzman *et al.*,

1991; Yu *et al.*, 1991; Foguet *et al.*, 1992a; Loric *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1992; Schmuck *et al.*, 1994; Roth *et al.*, 1998). Les trois récepteurs 5-HT₂ montrent une forte similarité de séquence entre eux qui atteint plus de 70% dans les passages transmembranaires (Leysen, 2004). Diverses études ont démontré que les récepteurs 5-HT₂ sont tous les trois couplés à une protéine G_{αq} et activent la phospholipase C, pour hydrolyser le PiP₂ en générant le second messager IP₃, menant à une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire (Conn and Sanders-Bush, 1984; Conn and Sanders-Bush, 1985; de Chaffoy *et al.*, 1985; Conn *et al.*, 1986; Watson *et al.*, 1995; Cox and Cohen, 1996). Les trois sous-types de récepteurs peuvent aussi activer la phospholipase A2 menant à la relâche d'acide arachidonique et certains agonistes favoriseraient l'une ou l'autre des voies (Felder *et al.*, 1990; Berg *et al.*, 1998). Les récepteurs de la famille 5-HT₂ se différencient pharmacologiquement des autres récepteurs à 5-HT de par leur forte affinité pour des agonistes comme l'α-méthyl-5-HT, le DOI, le DOB, le DOM et le mCPP et pour des antagonistes comme la kétansérine, la ritansérine et la miansérine (Tableau 3.2, page 45). Cependant, ils sont relativement difficiles à différencier entre eux et des ligands plus sélectifs doivent alors être utilisés. Par exemple, les antagonistes spiperone, kétansérine et MDL 100 907 ont une affinité 100 fois plus forte pour le récepteur 5-HT_{2A} que pour les récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}. L'agoniste BW 723C86 et l'antagoniste SB 2044741 sont relativement sélectifs pour le récepteur 5-HT_{2B} alors que l'agoniste RO 60-0175 et les antagonistes SB 242084 et RS-102221 le sont pour le récepteur 5-HT_{2C} (Tableau 3.2, page 45). Chez la souris, le gène du récepteur 5-HT_{2A} contient trois exons et code pour un polypeptide de 471 acides aminés (Yang *et al.*, 1992). Les études d'expression du récepteur 5-HT_{2A} par hybridation *in situ* et RT-PCR montrent qu'il est exprimé abondamment dans plusieurs zones du cerveau de mammifères incluant le télencéphale, le diencéphale, le mésencéphale, le métencéphale et le myélocéphale (Pompeiano *et al.*, 1994; Burnet *et al.*, 1995; Dwivedi and Pandey, 1998). La comparaison des sites d'expression de l'ARNm et de la protéine suggère une localisation principalement post-synaptique par rapport aux neurones 5-HT (Leysen, 2004). En périphérie, le récepteur 5-HT_{2A} est largement distribué et peut être détecté dans le système vasculaire, le système gastro-intestinal, les plaquettes, la rétine, le

	5-HT_{2A}	5-HT_{2B}	5-HT_{2C}
Agonistes			
5-MeOT	7.4	8.8	6.2
α -méthyl-5-HT	6.1	8.4	7.3
BW 723C86	<5.4	7.9	<6.9
RO 60-0175	6.0	5.8	8.8
mCPP	6.7	7.4	7.8
DOI	7.3	7.4	7.8
DOM	7.0	n.d.	6.7
DOB	7.4	n.d.	7.2
Antagonistes			
Spiperone	8.8	5.5	5.9
MDL 100 907	9.4	n.d.	6.9
Kétansérine	8.9	5.4	7.0
SB 2044741	<5.3	7.8	<6.0
SB 242084	6.8	7.0	9.0
RS-102221	6.0	6.1	8.4
SB 200646A	5.2	7.5	6.9
SB 206553	5.8	8.9	7.9
ICI 170809	9.1	n.d.	8.3
Ritansérine	8.8	8.3	8.9
Miansérine	8.1	7.3	8.0

Tableau 3.2 : Affinité (pEC₅₀ et pK_i) de divers ligands pour les récepteurs 5-HT₂.

Modifié de Barnes and Sharp (1999), avec ajouts de Glennon *et al.* (1992).

poumon, les lymphocytes, l'os, le poumon et le rein (Chaffoy *et al.*, 1985; Martin *et al.*, 1994; Ullmer *et al.*, 1995; Graf and Sarna, 1996; Imada-Shirakata *et al.*, 1997; Goppelt-Struebe and Stroebel, 1998; de Pootanakit *et al.*, 1999; Stefulj *et al.*, 2000; Bliziotis *et al.*, 2001; Marcos *et al.*, 2004). Dans le système reproducteur, il pourrait réguler la contraction du muscle lisse de l'utérus, augmenter la stéroïdogénèse du follicule ovarien et réguler le niveau de Ca^{2+} intracellulaire de l'ovocyte lui-même (Miyazaki *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1993; Karlsson *et al.*, 1997; Neilson *et al.*, 2000). En plus de son importance pour la régulation d'effets physiologiques sur la fonction reproductrice, l'expression du récepteur 5-HT_{2A} est à son tour modulée par des stéroïdes sexuels tels que les estrogènes et les androgènes (Fink *et al.*, 1996; Fink *et al.*, 1998). Par exemple, chez la rate, l'estradiol, dans son rétro-contrôle positif de relâche de la GnRH/LH, triple le niveau d'expression de l'ARNm du récepteur 5-HT_{2A} dans le noyau raphé dorsal, alors que l'ovariectomie réduit la densité de récepteur 5-HT_{2A} dans le cortex cérébral et le noyau accumbens (Sumner and Fink, 1993; Sumner and Fink, 1995). Le niveau d'expression du récepteur 5-HT_{2A} fluctuerait donc en phase avec le niveau d'oestradiol sanguin et le stade du cycle ovulatoire.

En plus des voies de transduction classiques menant à l'activation des phospholipases C et A₂, le récepteur 5-HT_{2A} peut activer plusieurs autres voies en fonction du type cellulaire où il est exprimé. Par exemple, il a été démontré que le récepteur 5-HT_{2A} est couplé positivement à la phospholipase D dans les cellules mésangiales du rein et couplé à l'adénylate cyclase dans les cellules neuronales A1A1, co-précipite avec les protéines Jak2 et STAT3 et régule la phosphorylation de ces facteurs dans les myoblastes, active les MAP kinases ERK1 et ERK2 dans les cellules musculaires vasculaires et régule l'ouverture de canaux calciques membranaires de l'aorte et l'activation d'un co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ dans des fibroblastes (Nakaki *et al.*, 1985; Berg *et al.*, 1994; Mayer and Sanders-Bush, 1994; Kurscheid-Reich *et al.*, 1995; Guillet-Deniau *et al.*, 1997; Florian and Watts, 1998).

Chez la souris, le gène du récepteur 5-HT_{2B} contient trois exons et code pour un polypeptide de 504 acides aminés (Foguet *et al.*, 1992b). L'ARNm du récepteur 5-HT_{2B} est détecté dans le cerveau humain, mais pas dans celui du rat (Kursar *et al.*, 1994; Bonhaus *et al.*, 1995). Par contre, sa distribution périphérique a été démontrée dans le

système vasculaire, les lymphocytes, l'estomac, l'os, l'intestin et le poumon (Ullmer *et al.*, 1995; Cox and Cohen, 1996; Stefulj *et al.*, 2000; Bliziotis *et al.*, 2001; Borman *et al.*, 2002; Marcos *et al.*, 2004).

Le “knockout” du récepteur 5-HT_{2B} a été effectué (Nebigil *et al.*, 2000). Le croisement de souris hétérozygotes ne donne pas un ratio mendélien normal puisque seulement 16.7% de souris homozygotes sont obtenues suggérant une léthalité embryonnaire. Une baisse de la fertilité est aussi observée chez les souris homozygotes. La léthalité embryonnaire serait due à un amincissement du myocarde induisant la rupture de celui-ci, la perte de sang dans le péricarde et la mort. Les auteurs ont aussi observé une chute de la prolifération des cellules dans le cœur des souris “knockout” naissantes et adultes. L'ensemble de ces données suggère un rôle important du récepteur 5-HT_{2B} dans la prolifération et la différenciation des cellules cardiaques (Nebigil *et al.*, 2000).

Chez la souris, le gène du récepteur 5-HT_{2C} contient quatre exons et code pour un polypeptide de 459 acides aminés (Yu *et al.*, 1991). L'ARNm du récepteur 5-HT_{2C} est largement distribué dans le SNC du rat, du singe et de l'humain (Molineaux *et al.*, 1989; Mengod *et al.*, 1990; Pasqualetti *et al.*, 1999; Lopez-Gimenez *et al.*, 2001). En périphérie, il serait peu exprimé et a été détecté uniquement dans le poumon (Wang *et al.*, 1999).

Le “knockout” du récepteur 5-HT_{2C} a été effectué (Tecott *et al.*, 1998). L'étude de la souris “knockout” suggère un rôle pour ce récepteur dans les processus d'apprentissage et le cycle éveil-sommeil. Les souris “knockout” pour ce gène sont fertiles et montrent une distribution mendélienne de leur descendance, excluant un rôle majeur de ce récepteur dans les processus liés à la reproduction ou au développement embryonnaire (Tecott *et al.*, 1998; Frank *et al.*, 2002).

3.2.2.3 La famille 5-HT₃

La famille des récepteurs 5-HT₃ est la seule qui n'est pas composée de RCPGs. Le récepteur 5-HT₃ est un récepteur-canal ionique, membre de la superfamille des récepteurs-canaux “Cys-loop”, qui comprend le récepteurs nicotiques de l'acétylcholine, le récepteur GABA_A et le récepteur de la glycine, et régule la

transmission chimique rapide de l'influx nerveux aux synapses du SNC, mais aussi la contraction intestinale (Eglen *et al.*, 1990; Reeves and Lummis, 2002). Cette fusion entre le site de liaison du ligand et le canal ionique permet la rapidité de transduction (Reeves and Lummis, 2002). Le site de liaison de la 5-HT se trouve dans la région extracellulaire du récepteur et la liaison de la 5-HT à ce domaine permet l'ouverture rapide d'un pore sélectif pour les cations mono- et divalents (Reeves and Lummis, 2002). Habituellement, il est relativement facile de différencier ce récepteur des autres sous-types étant donné sa voie de transduction unique et la disponibilité de molécules relativement spécifiques comme les agonistes m-chlorophénylbiguanide, le 2-méthyl-5-hydroxytryptamine, la quipazine ou les antagonistes MDL 72222 et zacopride (Costall and Naylor, 2004). À ce jour, cinq gènes ont été identifiés chez l'humain, les récepteurs 5-HT_{3A}, 5-HT_{3B}, 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} et 5-HT_{3E}, qui codent pour cinq sous-unités de ce récepteur, lesquelles fonctionneraient sous forme d'hétéropentamères dans la membrane (Miyake *et al.*, 1995; Davies *et al.*, 1999; Niesler *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2004).

Le "knockout" du récepteur 5-HT_{3A} a été effectué récemment et a permis de démontrer son implication dans le processus de perception de la douleur (Zeitz *et al.*, 2002). Le croisement de souris hétérozygotes montre un ratio mendélien de la descendance et pas d'effet majeur sur la fertilité (Zeitz *et al.*, 2002). Une autre étude effectuée sur ces mêmes souris "knockout" a aussi permis de démontrer l'implication potentielle du récepteur 5-HT₃ dans les attitudes liées à l'anxiété et la dépression, particulièrement chez les souris femelles (Bhatnagar *et al.*, 2004).

3.2.2.4 La famille 5-HT₄

La famille 5-HT₄ est codée par un gène unique, mais extrêmement complexe et qui génère de multiples variants d'épissage (Bockaert *et al.*, 2004). Par exemple, quatre cDNAs différents ont été clonés chez la souris (a, b, e et f), trois chez le rat (a, b et e) et neuf chez l'humain (a, b, c, d, e, f, g, n et hb), qui codent pour des protéines de 359-441 aa (Gerald *et al.*, 1995; Claeysen *et al.*, 1996; Blondel *et al.*, 1997, Claeysen *et al.*, 1997; Blondel *et al.*, 1998; Claeysen *et al.*, 1999; Mialet *et al.*, 2000a, b; Bach *et al.*, 2001; Vilario *et al.*, 2002). Toutes ces isoformes du récepteur 5-HT₄ sont générées à partir d'un site d'épissage alternatif situé à la position L³⁵⁸, qui génère des récepteurs avec des

extrémités C-terminales différentes, exception faite du récepteur 5-HT_{4hb} qui résulte de l'insertion de 14 aa dans la seconde boucle extracellulaire du récepteur et que l'on retrouve uniquement avec l'extrémité C-terminale de l'isoforme b.

La distribution du récepteur 5-HT₄ dans le cerveau a été étudiée chez plusieurs espèces. Son expression neuronale est vraisemblablement pré- et post-synaptique par rapport aux neurones à 5-HT (Bockaert *et al.*, 2004). Le récepteur 5-HT₄ est aussi retrouvé dans le tractus gastrointestinal, le cœur, la glande surrénale et la vessie (Hegde and Eglen, 1996).

Le récepteur 5-HT₄ (toutes les isoformes jusqu'à présent) est couplé positivement à l'adénylate cyclase via G_{as} (Claeysen *et al.*, 1997). Ce récepteur est caractérisé pharmacologiquement par une forte affinité pour des agonistes comme le 5-MeOT, l' α -méthyl-5-HT et le 5-CT, mais aussi pour des ligands spécifiques développés récemment, comme les agonistes PPB et BIMU8, et les antagonistes GR113808, SB204070 et RS100235 (Langlois and Fischmeister, 2003).

La souris "knockout" pour le 5-HT₄ commence à être étudiée et n'indique pas d'effet sur l'appétit et l'activité locomotrice normale, mais un effet en situation de stress, qui diminue l'effet anorexique et atténue la réponse motrice dans un nouvel environnement (Compan *et al.*, 2004a, b). Autre fait intéressant, seulement 18% des croisements avec des hétérozygotes donnent des souris homozygotes. Cependant, ces souris se développent normalement et ne montrent pas de différences sur des facteurs de poids, soif, métabolisme, attitude sociale ou sommeil.

3.2.2.5 La famille 5-ht₅

La famille 5-ht₅ est composée des récepteurs 5-ht_{5a} et 5-ht_{5b} et c'est la moins bien étudiée des familles de récepteurs à 5-HT. Le récepteur 5-ht_{5a} a été cloné chez la souris, le rat et l'humain, alors que le 5-ht_{5b} ne serait pas exprimé chez l'humain où le gène est interrompu par de multiples codons stop qui résultent en une protéine non fonctionnelle (Plassat *et al.*, 1992; Erlander *et al.*, 1993; Matthes *et al.*, 1993; Wisden *et al.*, 1993; Rees *et al.*, 1994; Grailhe *et al.*, 2001). Chez la souris, la comparaison des séquences montre une identité de 77% entre les récepteurs 5-ht_{5a} (357 aa) et 5-ht_{5b} (370 aa) (Nelson, 2004). Quelques études de l'expression des récepteurs 5-ht_{5a} et 5-ht_{5b}, permet

de les situer principalement sur des neurones du SNC, particulièrement dans le cas du 5-HT_{5b} que l'on retrouve uniquement dans quelques régions précises du cerveau de rongeurs. Le récepteur 5-HT_{5a} est toutefois largement distribué dans le SNC et en périphérie, dans des cellules neuronales ou d'origine neuronale comme les ganglions et le corps carotide (Plassat *et al.*, 1992; Erlander *et al.*, 1993; Matthes *et al.*, 1993; Wisden *et al.*, 1993; Rees *et al.*, 1994). La voie principale de couplage du récepteur 5-HT_{5a} impliquerait l'activation de protéines G_{i/o} et régulerait donc négativement l'adénylate cyclase (Carson *et al.*, 1996; Francken *et al.*, 2000). L'étude pharmacologique de ces deux récepteurs montre qu'ils ont des propriétés de liaison fort semblables; aucun ligand spécifique n'est encore disponible pour les différencier nettement des autres sous-types. Toutefois les agonistes 5-CT et LSD et les antagonistes méthiothépine, ritansérine et méthysergide auraient une affinité plus forte pour ces récepteurs que la 5-HT elle-même, permettant d'élaborer un profil partiel (Plassat *et al.*, 1992; Matthes *et al.*, 1993).

3.2.2.6 La famille 5-HT₆

La famille 5-HT₆ contient un récepteur codé par un gène unique dont la séquence du cDNA a été obtenue jusqu'à maintenant chez le rat (438 aa), l'humain (440 aa) et la souris (440 aa) (Monsma, Jr. *et al.*, 1993; Kohen *et al.*, 1996; Kohen *et al.*, 2001). La localisation du récepteur 5-HT₆ serait somato-dendritique dans les neurones sérotoninergiques du cerveau (Woolley *et al.*, 2004). Aucune étude ne rapporte l'expression de ce récepteur dans les tissus périphériques. Le récepteur 5-HT₆ possède toutes les caractéristiques structurales d'un RCPG et activerait préférentiellement, via une protéine G_{as}, l'adénylate cyclase (Monsma, Jr. *et al.*, 1993; Sebben *et al.*, 1994). Le profil pharmacologique du récepteur 5-HT₆ avec des ligands classiques ne permet pas de le différencier facilement des autres sous-types. Par exemple, l'ordre d'efficacité des ligands dans des essais *in vitro* menés sur des cellules transfectées avec les récepteurs 5-HT₆ de rat ou souris est : LSD > 5-méthoxytryptamine > 5-HT > 2-méthyl-5-HT > 5-CT, pour les agonistes, et méthiothépine > clozapine > miansérine = ritansérine, pour les antagonistes (Boess *et al.*, 1997). Cependant, de nouveaux ligands spécifiques sont devenus disponibles récemment et permettraient une identification plus précise de ce

récepteur, notamment les antagonistes Ro-04-6790 et Ro-63-0563 et l'agoniste EDMT (Sleight *et al.*, 1998; Glennon *et al.*, 2000).

3.2.2.7 La famille 5-HT₇

La famille des récepteurs 5-HT₇ est codée par un gène unique, mais est composée de plusieurs récepteurs par suite de l'épissage alternatif du gène. Le cDNA du récepteur 5-HT₇ a été cloné chez la souris, le rat, le cochon d'inde, le porc, l'humain et *Xenopus laevis* et la structure du gène, contenant deux introns, élucidée chez le rat et l'humain (Bard *et al.*, 1993; Lovenberg *et al.*, 1993; Plassat *et al.*, 1993; Tsou *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1995; Heidmann *et al.*, 1997; Bhalla *et al.*, 2002). Chez la souris, le récepteur complet est codé par une protéine de 448 acides aminés montrant une identité de séquence relativement faible (<40%) avec les autres RCPG à 5-HT. L'épissage alternatif du gène permet l'expression d'isoformes du récepteur, qui ont été identifiées chez le rat (isoformes a, b et c) et l'humain (isoformes a, b et d) mais non, jusqu'à ce jour, chez les autres espèces où seule l'homologue de l'isoforme a a été cloné (Heidmann *et al.*, 1997; Jasper *et al.*, 1997; Stam *et al.*, 1997; Heidmann *et al.*, 1998). Ces isoformes possèdent des extrémités C-terminales différentes qui n'influenceraient pas les propriétés de liaison ou de couplage des récepteurs, mais plutôt leurs propriétés de désensibilisation et de trafic via différents sites de phosphorylation situés dans leur extrémité C-terminale (Heidmann *et al.*, 1997; Krobert *et al.*, 2001; Krobert and Levy, 2002). De plus, les isoformes b et c posséderaient une séquence consensus pour un domaine PDZ, lequel joue un rôle important dans la localisation et la formation de complexes macromoléculaires (Hamblin *et al.*, 1998; Harris and Lim, 2001). Les isoformes ne possèdent pas un patron d'expression qui leur soit propre et on les retrouve dans des proportions variables mais semblables dans les différentes régions du cerveau et tissus de rat (isoforme a : environ 80%; isoforme b : 10-20%; isoforme c : moins de 5%) ou d'humain (isoforme a et b en quantité équivalente et c presque marginale) où le gène est exprimé (Stam *et al.*, 1997; Heidmann *et al.*, 1998).

L'étude des récepteurs 5-HT₇, dans des systèmes d'expression *in vitro* montre qu'ils sont couplés préférentiellement à une augmentation d'AMPC via G_{as} et l'adénylate cyclase (Bard *et al.*, 1993; Plassat *et al.*, 1993; Ruat *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 1993;

Thomas *et al.*, 1998; Krobert and Levy, 2002; Sheng *et al.*, 2005). Cependant, l'activation du récepteur 5-HT₇ pourrait aussi induire une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire tel qu'observé dans des cellules HEK293 transfectées avec le récepteur 5-HT₇ et les adénylates cyclases stimulées par la calmoduline AC1 ou AC8 (Baker *et al.*, 1998). La voie de transduction complète menant à cette augmentation de Ca²⁺ reste toutefois à déterminer; elle n'impliquerait pas la PKC, la voie de l'IP₃ ou des protéines G_i (Baker *et al.*, 1998). Un effet stimulateur de l'activation du récepteur 5-HT₇ sur les MAP kinase ERK1 et ERK2 a aussi été rapporté dans des neurones d'hippocampe de rat mis en culture (Errico *et al.*, 2001).

Des études d'hybridation *in situ* ont permis, chez le rat et le cochon d'Inde, de vérifier l'expression de l'ARNm du récepteur 5-HT₇ dans le cerveau et de localiser celui-ci dans le thalamus, l'hypothalamus, le cortex cérébral, l'hippocampe et l'amygdale (Ruat *et al.*, 1993; Tsou *et al.*, 1994; To *et al.*, 1995; Neumaier *et al.*, 2001). Son expression est principalement neuronale, mais on le retrouve aussi dans les astrocytes (Shimizu *et al.*, 1996; Hirst *et al.*, 1997). En périphérie, le récepteur 5-HT₇ est exprimé dans une variété de tissus, puisqu'on le retrouve dans le système vasculaire mais serait aussi présent dans le tubule proximal du rein, les cellules musculaires du tube digestif et la glande surrénale chez le rat, ainsi que les lymphocytes (Bard *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 1993; Ullmer *et al.*, 1995; Contesse *et al.*, 1999; Stefulj *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001). Dans le système reproducteur, le récepteur 5-HT₇ stimule la production de progestérone par les cellules de granulosa-lutéine humaines en culture et régule la relaxation de l'oviducte chez le porc (Graveleau *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2003).

Des études de radioliation menées sur les récepteurs 5-HT₇ de rat, de souris et d'humain ont montré un profil pharmacologique spécifique par rapport aux autres sous-types de récepteurs à 5-HT. L'ordre d'affinité des agonistes est le suivant : 5-CT > 5-MeOT > 5-HT > 8-OH DPAT > sumatriptan, alors que les antagonistes méthysergide, méthiothepine, mesulergine, métergoline, ritansérine, spiperone, clozapine et SB258719 sont les plus efficaces (Bard *et al.*, 1993; Plassat *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 1998).

Un "knockout" du récepteur 5-HT₇ a été réalisé chez la souris. Les auteurs de l'étude donnent très peu de détails sur la fonction reproductrice, mais mentionnent l'obtention

d'un ratio mendélien et la viabilité et fertilité des souris homozygotes (Hedlund *et al.*, 2003). Jusqu'à maintenant, la recherche sur le "knockout" du récepteur 5-HT₇ a été orientée essentiellement sur son effet hypothermique et la 5-HT, le 5-CT ou le 8-OH DPAT n'induisent plus d'effet hypothermique chez les souris "knockout" (Guscott *et al.*, 2003; Hedlund *et al.*, 2003; Hedlund *et al.*, 2004). Un déficit d'apprentissage a aussi été rapporté chez ces souris "knockout" (Roberts *et al.*, 2004).

3.2.3 Le transporteur membranaire à sérotonine

Le transporteur membranaire à 5-HT (SERT) permet la recapture spécifique de la 5-HT et ainsi d'interrompre l'interaction de cette dernière avec les récepteurs à 5-HT situés à la surface des cellules. L'internalisation de la 5-HT par le SERT permet donc de moduler la concentration extracellulaire de la 5-HT en plus de permettre son recyclage vers la voie de sécrétion ou sa dégradation par la MAO intracellulaire. Le SERT est exprimé dans de multiples cellules nerveuses et périphériques, incluant les neurones 5-HT du cerveau (Blakely *et al.*, 1998b), les neurones et cellules chromaffines de l'intestin (Gershon, 2003), les cellules chromaffines de la surrénale (Schroeter *et al.*, 1997), les plaquettes sanguines (Hranilovic *et al.*, 1996), les lymphocytes (Faraj *et al.*, 1994) et les cellules géantes du placenta (Yavarone *et al.*, 1993a). Son activité est sensible à la température, nécessite du Na⁺ et du Cl⁻ extracellulaire et est inhibée par des inhibiteurs métaboliques et de la Na⁺/K⁺ ATPase (Frazer and Hensler, 1999). L'énergie nécessaire au transport de la 5-HT ne serait pas utilisée directement par le SERT, mais nécessaire pour maintenir le gradient de Na⁺ dont le transport de 5-HT est dépendant. Ainsi, le SERT lie une molécule de 5-HT protonée, un ion Na⁺ et un ion Cl⁻, et le changement conformationnel qui s'en suit provoque l'ouverture d'un pore formé par une partie des passages transmembranaires du transporteur d'où l'entrée de la 5-HT et des ions à l'intérieur de la cellule (Frazer and Hensler, 1999).

Chez les mammifères, cette capacité de transport de la 5-HT est conférée par un seul transporteur qui est codé par un gène unique. Le cDNA du SERT a été initialement cloné chez le rat (Blakely *et al.*, 1991; Hoffman *et al.*, 1991), mais aussi chez la souris (Chang *et al.*, 1996) et code pour une protéine de 630 acides aminés, comportant 12 passages transmembranaires présumés, des extrémités N- et C-terminales du côté

cytoplasmique, des sites potentiels de N-glycosylation situés dans une grande 2^{ème} boucle extracellulaire et des sites potentiels de phosphorylation. Le SERT est un membre de la famille des transporteurs de neurotransmetteurs Na⁺/Cl⁻-dépendant qui comprend les transporteurs spécifiques de la dopamine, de la norépinéphrine, de la glycine et du GABA (Zahniser and Doolen, 2001).

Des informations importantes sur la fonction du SERT ont été obtenues grâce à l'obtention d'une souris "knockout" pour ce gène (Bengel *et al.*, 1998). D'abord, les souris "knockout" sont fertiles, ont des portées de taille normale et montrent un poids et une léthalité normale lorsque comparées à des souris non mutées. Ces souris homozygotes ne possèdent plus, dans le cerveau, de capacité de transport de la 5-HT ni de SERT détectable. Toutefois, la souris hétérozygote montre un V_{max} et un K_m de transport semblable à la souris sauvage et ce, malgré une réduction d'environ 50% de la densité du SERT, suggérant la présence de mécanismes de régulation post-transcriptionnels permettant une adaptation de la capacité de transport. De plus, le niveau de 5-HT chez la souris hétérozygote est à peu près le même que chez la souris sauvage, alors que l'homozygote montre une baisse de 60-80% du niveau de 5-HT dans différentes régions du cerveau et une baisse plus faible de son métabolite 5-HIAA. La souris "knockout" semble donc être capable d'adapter ses processus de synthèse et de métabolisme de la 5-HT (Bengel *et al.*, 1998).

Plusieurs voies seraient impliqués dans la régulation de l'activité du transporteur, mais de récentes données ont permis de démontrer l'importance d'un mécanisme de régulation du nombre des transporteurs à la surface des cellules. Ainsi, le PMA cause une réduction du nombre de SERT à la surface de cellules HEK transfectées avec le SERT (baisse du V_{max}), mais n'affecte pas l'efficacité du transporteur (K_m inchangé) (Qian *et al.*, 1997). Parallèlement, le PMA provoque une augmentation du niveau de phosphorylation du SERT (Ramamoorthy *et al.*, 1998). Une augmentation du niveau de phosphorylation du SERT, l'internalisation du transporteur et la diminution du transport de la 5-HT sont aussi observées en utilisant un inhibiteur des phosphatases PP1/PP2A, l'acide okadaïque, suggérant que la phosphorylation du SERT régulerait son internalisation et donc sa disponibilité pour internaliser la 5-HT (Ramamoorthy *et al.*, 1998). Toutefois, la phosphorylation par la PKC ou une kinase en aval de la PKC

semble nécessaire pour obtenir cet effet puisque, dans le même modèle de cellules HEK transfectées avec le SERT, des activateurs de PKA et de PKG augmentent le niveau de phosphorylation du SERT, mais sans diminuer le transport de 5-HT (Ramamoorthy *et al.*, 1998). Le transport de substrat par le transporteur pourrait s'opposer à cette internalisation du SERT puisque l'ajout au milieu externe de 5-HT, de D-amphétamine ou de fenfluramine, des substrats transportés par le SERT, inhibe la phosphorylation du SERT induite par le PMA, indiquant que le niveau d'activité du SERT auto-régulerait sa sensibilité à l'internalisation (Ramamoorthy and Blakely, 1999).

Présentement, plusieurs groupes tentent d'identifier les protéines qui interagissent directement avec le SERT et qui pourraient réguler son internalisation, mais des études plus approfondies seront nécessaires pour comprendre leur importance et leur mécanisme de fonctionnement (Blakely *et al.*, 1998a; Haase *et al.*, 2001). Le niveau d'expression du SERT serait aussi modulé par les hormones stéroïdes, puisque les singes ovariectomisés et traités avec des estrogènes montrent un niveau d'expression plus faible, dans les noyaux raphé dorsal et médian, que les singes simplement ovariectomisés (Pecins-Thompson *et al.*, 1998). Ainsi, la régulation du SERT semble un phénomène complexe, influencé par plusieurs facteurs et qui peut jouer un rôle important dans l'homéostasie des systèmes sérotoninergiques.

3.2.4 Les enzymes de dégradation de la sérotonine

La MAO catalyse la conversion de la 5-HT en 5-hydroxyacétaldéhyde et ce produit est ensuite oxydé par une aldéhyde déhydrogénase, dépendante du NAD^+ , en acide 5-hydroxyindole acétique (5-HIAA) ou en 5-hydroxytryptophol par une aldéhyde réductase dépendante du NADH (Frazer and Hensler, 1999). Il existe deux isoenzymes de la MAO nommées MAO-A et MAO-B. Ces enzymes sont des flavoprotéines qui se trouvent ancrées par un passage membranaire dans la membrane mitochondriale externe. Elles sont exprimées dans les neurones et cellules gliales, mais aussi dans plusieurs tissus périphériques incluant le foie, l'intestin, la glande surrénale, le testicule et l'ovaire (Van Der Vusse *et al.*, 1975; Westlund *et al.*, 1985; Yoshimoto *et al.*, 1986; Thorpe *et al.*, 1987; Billett, 2004). Les cDNA de la MAO-A (527 acides aminés) et de la MAO-B (520 acides aminés) ont été initialement clonés chez l'humain et l'analyse de leurs

séquences montrent une homologie de 70% (Bach *et al.*, 1988). *In vivo*, la 5-HT semble oxydée préférentiellement par la MAO-A, puisque l'injection de clorgyline, un inhibiteur spécifique de la MAO-A, augmente la concentration de 5-HT dans le cerveau de rat. L'étude des souris "knockout" pour les gènes de la MAO-A et de la MAO-B a d'ailleurs confirmé cette préférence. En effet, le cerveau des souris "knockout" pour la MAO-A montre un niveau surélevé de 5-HT jusqu'à 12 jours après la naissance, qui diminue par la suite pour atteindre des valeurs normales à 210 jours (Cases *et al.*, 1995). Ceci n'est pas observé dans le cas des souris "knockout" pour la MAO-B. Dans le cerveau de ces "knockout", la concentration de 5-HT est normale et seul le niveau de phényléthylamine est surélevé (Grimsby *et al.*, 1997). Les souris "knockout" pour la MAO-A montrent aussi une attitude plus agressive que les souris normales ou les souris "knockout" pour la MAO-B (Shih, 2004).

3.3 Systèmes sérotoninergiques, grands axes endocriniens et stéroïdogénèse

Il existe un lien bidirectionnel intime entre les systèmes sérotoninergiques et les hormones stéroïdes. En effet, il a été démontré que les estrogènes et progestines peuvent affecter la synthèse, le contenu, la relâche, la recapture, la dégradation de la 5-HT et de ces récepteurs au niveau du SNC, influençant des phénomènes comme l'humeur et la mémoire (Bethea *et al.*, 1998; Fink *et al.*, 1998). Aussi, la 5-HT régule, au niveau central, la relâche de GnRH et de LH et peut ainsi exercer une influence sur les axes hypothalamo-hypophyso-ovarien et testiculaire (Vitale and Chiochio, 1993). La 5-HT est aussi impliquée dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien en modulant la synthèse et la sécrétion du facteur de relâche de la corticotropine (CRF) et de l'hormone adénocorticotropique (ACTH) (Contesse *et al.*, 2000). Finalement, la 5-HT a aussi une influence sur ces trois grands axes endocriniens en tant que facteur paracrine modulant l'activité des cellules stéroïdogéniques de la glande surrénale, du testicule et de l'ovaire.

3.3.1 Glande surrénale et corticostéroïdes

La présence de la 5-HT et son rôle comme régulateur local de la sécrétion de stéroïdes par les cellules stéroïdogéniques de la glande surrénale ont été étudiés principalement chez la grenouille, le rat et l'humain. Des expériences *in vitro* ont permis de démontrer que la 5-HT stimule la sécrétion de corticostérone et d'aldostérone à partir de cellules surrénales de rat mises en culture, de fragments de glandes surrénales humaines ou de glandes surrénales perfusées de grenouille (Haning *et al.*, 1970; Delarue *et al.*, 1988b; Hinson *et al.*, 1989; Lefebvre *et al.*, 1992). La source de 5-HT et sa localisation cellulaire semblent toutefois varier d'une espèce à l'autre. Par exemple, la 5-HT est présente dans les cellules chromaffines de rat et de grenouille, alors que chez l'humain, elle serait restreinte aux mastocytes péri-vasculaires (Holzwarth and Brownfield, 1985; Delarue *et al.*, 1988a; Lefebvre *et al.*, 1992). Chez la grenouille, il a été démontré que les cellules chromaffines ont la capacité de synthétiser la 5-HT à partir du tryptophane (Delarue *et al.*, 1992). Toutefois, la présence de 5-HT dans les cellules chromaffines n'indique pas nécessairement une synthèse *de novo* puisque, chez le rat, la 5-HT n'est synthétisée qu'à partir du 5-hydroxytryptophane (Verhofstad and Jonsson, 1983). Ainsi, le transport de 5-HT pourrait expliquer sa présence dans les cellules chromaffines, tel que démontré chez la grenouille ou dans les cellules PC-12, cellules cancéreuses surrénales, chez le rat (Yoffe and Borchardt, 1982; Delarue *et al.*, 1992).

Pour ce qui est des récepteurs permettant la transduction du signal, il semble encore une fois exister des différences inter-espèces. Chez la grenouille et le rat, le récepteur 5-HT₄ serait impliqué, alors que chez la souris, il s'agirait plutôt du récepteur 5-HT₇ (Lefebvre *et al.*, 1992; Contesse *et al.*, 1994; Contesse *et al.*, 1999). Chez ces trois espèces, l'activation du récepteur mène à une augmentation d'AMPc, suivie d'une augmentation dans la concentration de Ca²⁺ intracellulaire via l'ouverture d'un canal T calcique situé dans la membrane plasmique (Contesse *et al.*, 2000; Lenglet *et al.*, 2002).

Finalement, chez l'humain, la MAO-A est détectée dans les cellules chromaffines suggérant une capacité de catabolisme (Lefebvre *et al.*, 2001). Ainsi, la glande surrénale possède la capacité de produire ou de transporter la 5-HT, un ou des récepteurs permettant la transduction du signal, et les enzymes permettant sa dégradation, donc un

système sérotoninergique complet permettant la régulation paracrine de la synthèse et de la sécrétion des corticostéroïdes.

3.3.2 Testicule et testostérone

Dans le testicule, la cellule interstitielle, ou cellule de Leydig, est le site de production de la testostérone (Haider, 2004). La synthèse de la testostérone est sous le contrôle endocrinien de la LH circulante via l'activation d'un récepteur spécifique à la surface des cellules de Leydig et d'une augmentation du second messenger AMPc. Cependant, la stéroïdogénèse est aussi modulée localement par divers facteurs autocrines et paracrines, incluant la 5-HT et le CRF (Leung and Steele, 1992).

Dans le testicule de rat et de hamster, la 5-HT est détectable dans la capsule et les cellules interstitielles et sa concentration dans le liquide interstitiel est supérieure à celle du plasma sanguin (Campos *et al.*, 1990; Frungieri *et al.*, 1999). La source de la 5-HT testiculaire n'a pas été identifiée avec certitude, mais pourrait être multiple. En effet, une certaine quantité de la 5-HT testiculaire proviendrait du nerf spermatique supérieur, puisque son excision unilatérale cause une baisse d'environ 34% du niveau de 5-HT dans le testicule (Campos *et al.*, 1990). Une autre source de 5-HT serait les mastocytes, qui ont la capacité de synthétiser la 5-HT; ces derniers sont présents uniquement dans la capsule testiculaire et très rarement dans le tissu interstitiel (Frungieri *et al.*, 1999). Finalement, une certaine quantité de 5-HT résulterait d'une synthèse locale, puisque les cellules de Leydig expriment la TPH (Frungieri *et al.*, 2002) et ont la capacité de sécréter la 5-HT en réponse à la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) (Tinajero *et al.*, 1993). Cette sécrétion de 5-HT permettrait une boucle de rétro-contrôle limitant la synthèse de testostérone en réponse à la stimulation du récepteur à LH. En effet, les cellules de Leydig de rat en culture sécrètent du CRF, lequel agit comme un inhibiteur de l'action gonadotrope (Dufau *et al.*, 1993). La sécrétion basale de CRF des cellules est très faible, mais peut être stimulée par l'hCG et des analogues de l'AMPc. La 5-HT stimule aussi de la sécrétion de CRF et inhibe la production d'AMPc et de testostérone induite par l'hCG (Dufau *et al.*, 1993). Cet effet peut être mimé par l'agoniste DOI ou inhibé par l'antagoniste kétansérine, suggérant l'implication d'un récepteur 5-HT_{2A} (Tinajero *et al.*, 1992). De plus, la sécrétion de CRF induite par l'hCG est bloquée par la

kétansérine, alors que l'inhibition de la sécrétion de la testostérone par le CRF ne l'est pas. Finalement, l'effet de la 5-HT est inhibé par un anticorps dirigé contre le CRF ou un antagoniste de récepteur à CRF, suggérant que l'action de la 5-HT est transmise par le CRF (Dufau *et al.*, 1993). Ainsi, l'hCG provoquerait une sécrétion AMPc-dépendante de 5-HT, qui agirait via un auto-récepteur 5-HT_{2A} pour provoquer la sécrétion de CRF, inhibant ainsi la production d'AMPc et de testostérone. Des résultats semblables ont été obtenus chez le hamster (Frungieri *et al.*, 1999; Frungieri *et al.*, 2002) et ces données ont été confirmées *in vivo*, puisque l'injection intra-testiculaire de 5-HT cause une baisse du niveau sanguin de testostérone (Csaba *et al.*, 1998). La 5-HT permet donc une régulation locale et autocrine de la sécrétion de testostérone dans le testicule.

3.3.3 Ovaire, estradiol et progestérone

Il existe aussi des données qui suggèrent une implication de la 5-HT dans la stéroïdogénèse ovarienne. Par exemple, il a été démontré chez le rat que la 5-HT est présente dans l'ovaire et que son niveau varie en fonction du cycle estral (Clausell and Soliman, 1978). La source de la 5-HT ovarienne n'a jamais été identifiée avec certitude jusqu'à maintenant, mais elle a été localisée dans les fibres nerveuses qui entourent l'ovaire et les mastocytes qui se trouvent disséminés dans le stroma ovarien chez le rat (Amenta *et al.*, 1992). Une étude menée sur des follicules pré-ovulatoires de rat cultivés *in vitro* a démontré que la 5-HT stimule la sécrétion d'estradiol et de progestérone et que cette stimulation peut être inhibée par la kétansérine suggérant l'expression d'un récepteur 5-HT_{2A} (Tanaka *et al.*, 1993). Des résultats similaires ont été obtenus chez le hamster doré, où la 5-HT et le 8-OH DPAT stimulent la sécrétion d'estradiol et d'androstènedione par le follicule pré-ovulatoire cultivé *in vitro*; cette stimulation est sensible à l'antagoniste miansérine, mais pas à la kétansérine (Terranova *et al.*, 1990). Cette même étude a aussi permis de démontrer que la présence d'IBMX dans le milieu de culture était nécessaire à cette stimulation, suggérant l'implication de l'AMPc dans ce processus. Des effets positifs de la 5-HT sur la sécrétion de progestérone ont aussi été rapportés lors d'études menées sur des cellules de granulosa de porc ou lutéales de vache en culture, mais encore une fois sans identifier clairement le récepteur ou la voie de

transduction impliquée dans le processus (Battista and Condon, 1986; Battista *et al.*, 1987; Sirotkin, 1995).

C'est chez l'humain qu'existe le plus grand nombre de données sur l'implication de la 5-HT dans la stéroïdogénèse folliculaire. En effet, une concentration de 0.81 μM de 5-HT a été détectée dans le liquide folliculaire humain (Bodis *et al.*, 1992a; Bodis *et al.*, 1993). De plus, la 5-HT stimule la sécrétion d'estradiol et de progestérone par les cellules de granulosa humaines en culture (Bodis *et al.*, 1992b; Gravelleau *et al.*, 2000; Koppan *et al.*, 2004). Lorsque mise en présence de ces cellules, la 5-HT provoque une augmentation dose-dépendante de l'AMPc et l'étude pharmacologique et moléculaire indique clairement la présence et la fonctionnalité d'un récepteur 5-HT₇ (Gravelleau *et al.*, 2000). La diversité des espèces et modèles cellulaires étudiés complique l'interprétation des résultats et ne permet pas encore de préciser le rôle que joue *in vivo* la 5-HT dans la stéroïdogénèse folliculaire. Cependant, l'influence de la 5-HT observée chez toutes ces espèces suggère l'universalité du processus chez les mammifères.

3.4 La sérotonine : régulateur local de la fonction reproductrice femelle

Cette section expose les données concernant les fonctions potentielles et établies de la 5-HT dans le système reproducteur femelle de différentes espèces. Les données obtenues jusqu'à maintenant démontrent bien l'universalité du rôle de régulateur local de la 5-HT sur cette fonction reproductrice, puisqu'elles proviennent de modèles animaux très divers, des invertébrés marins jusqu'aux mammifères rongeurs.

3.4.1 Chez les invertébrés marins bivalves

La 5-HT serait impliquée dans le processus de la ponte et de reprise de la méiose chez une variété de mollusques bivalves. Ainsi, la 5-HT induit la ponte chez les pétoncles *Patinopecten yessoensis*, *Argopecten irradians*, *Chlamys asperrima*, chez les moules *Geukensia demissa* et *Dreissena polymorpha* et chez les palourdes *Mercenaria mercenaria*, *Arctica islandica*, *Tivela stultorum*, *Macra chinensis*, *Hippopus porcellanus*, *Tridacna gigas*, *Spisula sachalinensis* et *Spisula solidissima* (Matsutani and Nomura, 1982; Gibbons and Castagna, 1984; Crawford *et al.*, 1986; Alcazar *et al.*, 1987;

Hirai *et al.*, 1988; Ram *et al.*, 1993; O'Connor and Heasman, 1995; Alvarado-alvarez *et al.*, 1996; Fong *et al.*, 1996). Non seulement la 5-HT est-elle présente dans le système nerveux de ces bivalves, mais elle est aussi présente dans la gonade elle-même. Par exemple, chez *Patinopecten yessoensis*, *Dreissena polymorpha* et *Spisula solidissima*, l'existence de fibres sérotoninergiques autour des acini contenant les gamètes est en accord avec une implication physiologique de la 5-HT dans le processus de la ponte (Matsutani and Nomura, 1986; Ram *et al.*, 1992; Masseau *et al.*, 2002). La présence de la 5-HT dans la gonade et la sensibilité de la ponte à celle-ci chez toutes ces espèces suggère un rôle de principal inducteur chez les bivalves. Toutefois, dans les études où le profil pharmacologique du récepteur a été pris en compte, l'identité du (ou des) récepteur impliqué dans ce phénomène n'a pu être identifié clairement, ne correspond pas à un sous-type déjà identifié chez les mammifères et pourrait évidemment varier d'une espèce à une autre (Matsutani and Nomura, 1986; Matsutani and Nomura, 1987; Fong *et al.*, 1993; Fong *et al.*, 1994a; Fong *et al.*, 1996; Ram *et al.*, 1996; Fong *et al.*, 2003).

Le rôle de la 5-HT comme régulateur local de la fonction reproductrice des bivalves n'est cependant pas restreint au processus de ponte, mais concernerait aussi la maturation méiotique des ovocytes. Chez une majorité d'espèces d'invertébrés bivalves, les ovocytes sont arrêtés en prophase I du cycle cellulaire et devront reprendre leur maturation, sous l'influence d'un stimulus, jusqu'en métaphase I, où ils seront alors fécondables par le spermatozoïde. La 5-HT pourrait être ce stimulus puisqu'elle induit la reprise de la méiose jusqu'en métaphase I chez les bivalves *Ruditapes philippinarum*, *Hiattella flaccida*, *Dreissena polymorpha* et *Crassostrea gigas* (Fong *et al.*, 1994b; Gobet *et al.*, 1994; Deguchi and Osanai, 1995; Kyojuka *et al.*, 1997). Chez ces espèces, le récepteur impliqué et la voie de transduction activée n'ont pas été caractérisés avec précision, mais la mobilisation de Ca^{2+} intracellulaire via des réserves IP_3 -sensibles a été démontrée chez *Ruditapes* et *Hiattella*, alors que chez *Crassostrea*, aucun changement dans la concentration de Ca^{2+} intracellulaire n'a été détecté lors de la maturation (Gobet *et al.*, 1994; Deguchi and Osanai, 1995; Kyojuka *et al.*, 1997). Ainsi, la 5-HT pourrait promouvoir la maturation ovocytaire de ces espèces via des récepteurs spécifiques, mais par des voies de transduction différentes selon l'espèce étudiée.

3.4.2 Chez la palourde *Spisula solidissima*

C'est chez *Spisula solidissima* que l'effet de la 5-HT sur les ovocytes a été initialement décrit, en 1988, par un groupe de chercheurs japonais. Ces auteurs ont pu démontrer que l'ajout de 10-100 μM 5-HT à des ovocytes de *Spisula*, *in vitro*, provoquait une série d'événements cellulaires associés à l'activation, incluant la rupture de la vésicule germinale (GVBD), la condensation des chromosomes, l'expulsion des globules polaires et la formation des pronuclei (Hirai et al., 1988).

L'étude de la voie de transduction activée par la 5-HT a permis d'en déterminer plusieurs effecteurs importants et de constater sa similitude avec celle de l'activation lors de la fécondation par le spermatozoïde. Premièrement, l'importance du Ca^{2+} comme second messenger à la fécondation est reconnu chez *S. solidissima*, tout comme dans l'ensemble du règne animal (Dubé, 1996; Stricker, 1999). La stimulation par la 5-HT provoque une augmentation rapide de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire (Colas and Dubé, 1998) et ce niveau élevé de Ca^{2+} est maintenu pendant au moins 15 minutes (Juneja *et al.*, 1994). Le Ca^{2+} proviendrait du milieu externe, puisque la hausse du Ca^{2+} intracellulaire induite par la 5-HT nécessite la présence de Ca^{2+} dans le milieu externe et est sensible au verapamil, un bloqueur de canal calcique voltage-dépendant (Juneja *et al.*, 1994). De plus, la 5-HT provoque une incorporation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ du milieu externe, alors que l'activation de l'ovocyte (déterminée par l'observation de la GVBD) n'a pas lieu dans un milieu sans Ca^{2+} (Krantic et al., 1991). L'activation du récepteur à 5-HT et la fécondation provoqueraient donc l'ouverture de canaux calciques dans la membrane plasmique de l'ovocyte, mais l'importance d'une libération de Ca^{2+} à partir des réserves internes reste à déterminer, pour l'un ou l'autre des activateurs. Deuxièmement, l'activation causée par la 5-HT provoque une augmentation du second messenger AMPc et cette augmentation est aussi observée lors de la fécondation (Yi *et al.*, 2002). La 5-HT provoque aussi une augmentation du pH intracellulaire des ovocytes de 0.34 unités de pH, alors que la fécondation provoque une augmentation équivalente (Dubé and Eckberg, 1997). Finalement, la stimulation des ovocytes de *Spisula* par la 5-HT, tout comme la fécondation naturelle (Shibuya *et al.*, 1992), provoque la phosphorylation rapide et transitoire d'une protéine de 42 kDa reconnue par un anticorps anti-ERK/MAP

kinase et la déphosphorylation d'une protéine de 34 kDa reconnue par un anticorps anti-cdc2 kinase peu de temps après la GVBD (Abdelmajid *et al.*, 1994); cette kinase est associée à la cycline B dans le complexe protéique MPF, dont le rôle est central dans la régulation du cycle cellulaire et la reprise de la méiose (Dorée and Hunt, 2002). L'étude des seconds messagers, effecteurs et de la séquence temporelle d'activation n'a donc pas permis jusqu'à maintenant de différencier l'activation par la 5-HT de la fécondation elle-même.

Les études sur le rôle potentiel de la 5-HT dans l'activation des ovocytes de *Spisula* ne se limitent toutefois pas à l'étude de la voie de transduction. En effet, d'autres études se sont intéressées à la caractérisation du récepteur impliqué. Une étude pharmacologique, évaluant le pourcentage de GVBD des ovocytes traités, a permis de déterminer que la 5-HT était le plus efficace des agonistes avec un EC_{50} de 0.55 μ M, suivi du 8-OH DPAT et des agonistes 2-méthyl-5-HT et TFMPP (Krantic *et al.*, 1991). Par ailleurs, des essais d'inhibition de la GVBD induite par la 5-HT ont permis de démontrer un profil d'antagonistes dont l'ordre d'efficacité était le suivant : ritansérine > ICS205930 > miansérine, kétansérine, propranolol > métoclopramide = yohimbine > spiperone (Krantic *et al.*, 1991). Les propriétés de liaison du récepteur exprimé dans les ovocytes de *Spisula* ont aussi été étudiées lors d'essais de radioliasion avec divers agonistes et antagonistes contre la 5-HT tritiée. Cette étude a permis de démontrer que l'agoniste 8-OH DPAT possédait une affinité supérieure à la 5-HT, alors que le TFMPP possédait très peu d'affinité pour le récepteur (Krantic *et al.*, 1993). Cette même étude a aussi évalué divers antagonistes de récepteurs à 5-HT; les plus efficaces ont été la métoclopramide et le MDL 72222, suivis de la ritansérine et de la miansérine, puis du propranolol, de l'ICS 205930 et de l'imipramine (Krantic *et al.*, 1993). L'analyse de l'ensemble de ces données n'a pas permis aux auteurs de déterminer le type de récepteur impliqué, puisque son profil pharmacologique ne correspondait à aucun sous-type déjà identifié chez les mammifères, ni d'en déduire la ou les voie(s) de transduction. Les résultats montrent toutefois qu'un seul récepteur, spécifique à la 5-HT, serait présent à la surface des ovocytes. Une identification de sa séquence primaire sera nécessaire afin d'en savoir plus.

L'implication physiologique réelle de la 5-HT dans l'activation ovocytaire chez *Spisula solidissima* reste donc encore à démontrer, même s'il a été observé qu'une dose nanomolaire de 5-HT augmente la fécondabilité des ovocytes (Juneja *et al.*, 1993). Ainsi, au moment de la ponte provoquée par la 5-HT, une certaine quantité de 5-HT gonadique pourrait atteindre les ovocytes et faciliter leur fécondation subséquente par le spermatozoïde.

3.4.3 Chez les némerthes *Cerebratulus lacteus* et *Micrura alaskensis*

Les némerthes sont des vers protostomes marins qui possèdent des ovocytes fécondables en métaphase I dans l'eau de mer. Les ovocytes des espèces *Cerebratulus lacteus* et *Micrura alaskensis*, arrêtés en prophase I, reprennent la méiose jusqu'en métaphase I lorsqu'ils sont exposés à la 5-HT (Stricker and Smythe, 2000). Cet effet de la 5-HT est dose-dépendant et peut se dérouler malgré l'absence de Ca^{2+} dans le milieu externe. L'utilisation d'inhibiteurs des canaux calciques (cobalt, verapamil ou méthoxyverapamil) ou d'un chélateur du Ca^{2+} intracellulaire (BAPTA-AM) n'empêche pas la GVBD induite par la 5-HT, qui se déroule en l'absence de fluctuations majeures du Ca^{2+} intracellulaire (Stricker and Smythe, 2000). De plus, la 5-HT provoque une forte augmentation d'AMPc qui peut être inhibée par l'injection de GDP β S ou l'incubation dans des inhibiteurs de PKA (Rp-cAMP-S ou H-89), suggérant l'activation d'un RCPG couplé à une protéine G_s avec activation d'une adénylate cyclase et de la PKA (Stricker and Smythe, 2001). Ainsi, contrairement à une majorité d'invertébrés marins bivalves, la GVBD chez le némerthe ne dépendrait pas d'une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, mais d'une activation de la PKA via une augmentation d'AMPc. L'étude pharmacologique du récepteur confirme en partie ceci, puisque le RS-23597-190, un antagoniste de récepteur 5-HT $_4$, inhibe de façon dose-dépendante la GVBD induite par la 5-HT, alors que le PPB, agoniste 5-HT $_4$, stimule la GVBD de façon dose-dépendante (Stricker and Smythe, 2001).

L'implication physiologique réelle de la 5-HT, *in vivo*, chez les némerthes reste encore à démontrer, mais les ovocytes répondent clairement à la 5-HT *in vitro*, alors que la présence de 5-HT dans des extraits tissulaires de *Cerebratulus lacteus* suggère son implication dans le mécanisme de régulation méiotique.

3.4.4 Chez le poisson *Fundulus heteroclitus*

Chez ce vertébré, la 5-HT ne semble pas réguler la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa, mais influence plutôt la maturation méiotique. En effet, chez *F. heteroclitus*, la reprise de la méiose, indiquée par la GVBD d'ovocytes folliculaires, peut être induite à l'aide de gonadotrophines ou du stéroïde 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β P) lors d'expériences menées *in vitro*, et cet effet du 17,20 β P inhibé de façon dose-dépendante par la 5-HT (Cerdea *et al.*, 1995, 1997). L'effet inhibiteur de la 5-HT peut être mimé par des agonistes de récepteurs à 5-HT et bloqué par des antagonistes, mais le profil pharmacologique résultant ne correspond pas à un type de récepteur mammifère en particulier. L'effet de la 5-HT s'effectuerait via l'activation d'un récepteur ovocytaire, puisque la GVBD des ovocytes dénudés est aussi sensible à la 5-HT (Cerdea *et al.*, 1997). C'est le niveau d'AMPc qui régule la GVBD, puisque l'activation du récepteur à 5-HT provoque une augmentation d'AMPc alors que le 17,20 β P provoque une baisse d'AMPc inhibée par la 5-HT (Cerdea *et al.*, 1998a). De plus, la molécule H8, un inhibiteur de PKA, induit la reprise de la méiose et empêche l'effet inhibiteur de la 5-HT, suggérant une implication de la PKA dans ce phénomène (Cerdea *et al.*, 1998a). La présence ou le rôle physiologique de la 5-HT *in vivo* n'a pas encore été démontré, mais il est intéressant de noter que l'efficacité de la 5-HT à inhiber la maturation induite par le 17,20 β P diminue au fur et à mesure que le follicule grossit du stade vitellogénique tardif au stade de maturation précoce, suggérant un changement de sensibilité à la 5-HT en fonction de l'état de maturation folliculaire (Cerdea *et al.*, 1998b).

3.4.5 Chez les grenouilles *Bufo viridis* et *Xenopus laevis*

Chez la grenouille, des résultats contradictoires ont été obtenus quant à l'implication de la 5-HT dans la maturation ovocytaire. Il a été rapporté que la 5-HT et les agonistes 5-chlorotryptamine ou 5-éthyltryptamine, ajoutés au milieu ou injectés dans les ovocytes, inhibent la maturation ovocytaire induite par la progestérone chez *Bufo viridis* et *Xenopus laevis* (Buznikov *et al.*, 1993). De plus, l'antagoniste inmecarb méthiodide induit la maturation méiotique chez ces deux espèces, alors que les ovocytes dénudés ou

intacts (entourés d'une mince couche de cellules folliculaires) ont des sensibilités différentes lorsque mis en présence de 5-HT ou de l'inmecarb méthiodide, suggérant l'expression de sites de liaison à la fois sur l'ovocyte et les cellules folliculaires (Buznikov *et al.*, 1993). L'antagoniste miansérine induit aussi la GVBD, *in vitro*, chez les ovocytes de *Xenopus*, et cet effet est coopératif avec la progestérone (Hanocq-Quetier and Baltus, 1981). La ritansérine, un autre antagoniste de récepteur à 5-HT, cause aussi un effet semblable sur la maturation méiotique des ovocytes de *Xenopus* (Sheng *et al.*, 2005). Cependant, contrairement aux résultats de Buznikov, la même étude rapporte que la 5-HT n'inhibe pas la reprise de la méiose induite par la progestérone chez *Xenopus laevis*, que ce soit pour les ovocytes dénudés ou intacts (Sheng *et al.*, 2005). De plus, la 5-HT n'est pas détectée dans les ovocytes de Xénope ou dans un milieu conditionné avec des ovocytes, mais est présente dans les follicules intacts, qui contiennent des vaisseaux sanguins, confirmant l'absence de 5-HT dans les ovocytes et les cellules directement en contact avec lui (Sheng *et al.*, 2005).

Finalement, il est intéressant de noter que le clonage et le séquençage du récepteur 5-HT₇ chez *Xenopus* a été effectué à partir d'une banque de cDNA d'ovocytes (Nelson *et al.*, 1995). De plus, des résumés d'articles écrits en russe par le groupe de Buznikov (Nikitina *et al.*, 1988; Nikitina *et al.*, 1993; Nikitina and Buznikov, 1996) supportent l'effet de la 5-HT sur la maturation méiotique, et les articles de revue, publiés par le même groupe, suggèrent que la 5-HT permet le maintien en arrêt méiotique des ovocytes de *Bufo viridis* et de *Xenopus laevis* (Buznikov *et al.*, 1996; Buznikov *et al.*, 1999).

3.4.6 Chez le hamster doré *Mesocricetus auratus*

Il existe très peu de données sur l'effet de la 5-HT sur les ovocytes de mammifères. Toutefois, chez le hamster doré, la 5-HT provoque une augmentation de la concentration intracellulaire du Ca²⁺ des ovocytes. Cette augmentation a pu être initialement détectée par mesure de l'hyperpolarisation qui lui est associée et l'utilisation de l'aequorine, une protéine luminescente sensible au Ca²⁺ (Miyazaki *et al.*, 1990). Par la suite, cette réponse calcique a été confirmée par l'utilisation des indicateurs fluorescents "calcium green-1" ou "fura-2 AM" (Fujiwara *et al.*, 1993; Shiraishi *et al.*, 1995). L'utilisation de ce dernier indicateur a d'ailleurs permis de quantifier la réponse calcique avec un pic de

500 nM, après l'ajout d'une dose de 75 nM de 5-HT (Fujiwara *et al.*, 1993). La concentration minimale de 5-HT qui provoque cette réponse est de 50 nM et l'ajout d'une dose plus importante de 5-HT peut entraîner plusieurs oscillations calciques (4 à 6 oscillations à 10 μ M) et réduire le délai de réponse (Miyazaki *et al.*, 1990). Ces réponses calciques sont complètement inhibées par la microinjection d'un anticorps dirigé contre le récepteur à IP₃, suggérant l'activation d'un récepteur couplé à la voie de la PLC (Fujiwara *et al.*, 1993). La réponse à la 5-HT peut aussi être inhibée par l'utilisation du PMA, un activateur de la protéine kinase C (PKC), ou sensibilisée par la sphingosine, un inhibiteur de PKC, suggérant un effet désensibilisateur de la PKC sur la réponse à la 5-HT (Miyazaki *et al.*, 1990). De plus, une exposition répétée ou prolongée à la 5-HT provoque une désensibilisation de la réponse; suggérant qu'une boucle de rétro-contrôle, impliquant potentiellement l'activation de la PKC par le DAG produit par la PLC, agirait pour réduire ou limiter la réponse (Miyazaki *et al.*, 1990). Finalement, ces réponses calciques sont sensibles à la cyproheptadine, la spiperone et la kétanserine, suggérant l'implication d'un récepteur de type 5-HT_{2A}.

Les oscillations calciques provoquées par la 5-HT et la voie de transduction activée par celle-ci suggèrent donc son implication dans la régulation calcique des ovocytes de hamster doré.

3.5 La sérotonine et le développement embryonnaire précoce

L'implication de neurotransmetteurs et plus particulièrement de la 5-HT dans le développement embryonnaire est soupçonné depuis longtemps déjà. Plusieurs séries d'expériences effectuées au cours des dernières décennies, en particulier chez les oursins, supportent cette hypothèse. Elles ont mené à l'élaboration de modèles sur l'origine évolutive de la 5-HT et notamment du modèle de la protosynapse de Shmukler, proposé comme précurseur ontogénétique et phylogénétique de la synapse neuronale et régulateur des divisions embryonnaires (Buznikov and Shmukler, 1981; Buznikov *et al.*, 1996; Shmukler and Buznikov, 1998; Buznikov *et al.*, 1999). Dans ce modèle, l'espace fermé entre les différents blastomères de l'embryon est considéré comme un analogue de la synapse neuronale. La 5-HT, qui est détectée, entre autres, dans l'embryon 1 cellule

et en division de l'oursin de mer *Strongylocentrotus intermedius* (Buznikov *et al.*, 1972), serait sécrétée par les blastomères dans cet espace. La 5-HT pourrait alors interagir avec des récepteurs à 5-HT classiques, exprimés à la membrane des blastomères, et ainsi réguler les interactions entre les blastomères. La présence de ces récepteurs a d'ailleurs été démontrée. Par exemple, les embryons fraîchement fécondés de *S. intermedius* expriment un site de liaison au 8-OH DPAT à leur surface (Shmukler, 1993). Aussi, des antagonistes de récepteurs à 5-HT non perméables aux membranes causent une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire et la régression du premier sillon de clivage, suggérant un lien possible entre la 5-HT, la régulation calcique intracellulaire et la régulation d'événements associés à la division cellulaire (Shmukler *et al.*, 1999). De plus, une étude sur les embryons de l'oursin plat *Scaphechinus mirabilis* a permis de démontrer que la 5-HT régule la communication entre les blastomères. En effet, dans cette expérience, les deux blastomères étaient isolés après la première division cellulaire puis, mis en culture séparément. Il a été observé qu'une majorité des blastomères isolés se développait normalement, avec une 4^{ième} division cellulaire produisant des blastomères de taille égale, et pouvait former un organisme complet. Cependant, en présence de 5-HT, le nombre d'embryons avec une 4^{ième} division produisant des blastomères asymétriques, comme s'il s'agissait de demi-embryons, était doublé, suggérant que la 5-HT puisse mimer la présence d'un blastomère (Buznikov and Shmukler, 1981).

Cependant, l'implication de la 5-HT apparaît encore plus complexe puisque les embryons exprimeraient aussi des sites de liaison intracellulaire pour la 5-HT. Un des principaux arguments en faveur de la localisation intracellulaire de sites de liaison dans l'embryogénèse est la plus grande efficacité rapportée d'indolylalkylamines tertiaires pouvant pénétrer les cellules plus facilement que leurs analogues quaternaires (Landau *et al.*, 1981). La nature exacte de ces sites n'est pas encore établie, mais l'existence de sites de liaison situés directement sur le cytosquelette, de récepteurs intracellulaires encore inconnus (mais couplés à des seconds messagers), ou de récepteurs classiques localisés à l'intérieur des cellules ont été suggérés, comme autant de possibilités (Shmukler and Buznikov, 1998; Buznikov *et al.*, 1999).

Les fonctions particulières associées à la 5-HT pendant l'embryogénèse doivent toutefois être considérées en fonction de l'espèce étudiée. Ainsi, les fonctions intracellulaires de la 5-HT pourraient être plus importantes chez les animaux au développement embryonnaire mosaïque, possédant un cytoplasme extrêmement polarisé. Chez les espèces au développement embryonnaire externe, la 5-HT serait synthétisée par l'embryon, alors que chez les animaux au développement interne, comme les mammifères, la mère pourrait en être la source (Buznikov *et al.*, 1999).

Chez les mammifères, le nombre d'étude sur l'implication de la 5-HT dans le développement embryonnaire précoce est moins abondant, mais ces études suggèrent tout de même une implication. Par exemple, la 5-HT est retrouvée dans les tissus reproducteurs comme l'oviducte, l'utérus et le placenta (Amenta *et al.*, 1992; Yavarone *et al.*, 1993a). Sa présence est aussi détectée par immunocytochimie dans les embryons 2 cellules, 4 cellules, morula et blastocytes (Il'kova *et al.*, 2004) et sa synthèse par l'embryon rendue possible par l'expression de la TPH dans les embryons 1 cellule et les cellules souches embryonnaires du blastocyste (Walther and Bader, 1999). Pour ce qui est des récepteurs à 5-HT exprimés, seule l'expression du récepteur 5-HT_{1D} dans les embryons 1 cellule, 2 cellules, morula et blastocystes a été rapportée jusqu'à maintenant. De plus, la culture *in vitro* d'embryons dans un milieu contenant du sumatriptan (agoniste non sélectif de récepteur 5-HT_{1D}) ou de la 5-HT montre qu'un plus faible nombre d'embryons survit jusqu'au stade blastocystes et avec un plus faible nombre de cellules suggérant l'implication de la 5-HT dans les mécanismes de survie et de division cellulaire (Vesela *et al.*, 2003; Il'kova *et al.*, 2004).

3.6 La sérotonine et le développement embryonnaire tardif

Ce rôle "pré-neuronal" des neurotransmetteurs et de la 5-HT en particulier s'étend aussi aux processus plus tardifs du développement embryonnaire. Ainsi, chez la souris, la 5-HT est détectée dans le placenta primitif et le placenta aux jours embryonnaires 9-12 (Yavarone *et al.*, 1993a). La source de cette 5-HT ne serait pas l'embryon lui-même (pas d'augmentation ou de baisse du niveau de 5-HT lorsque l'embryon est traité avec le tryptophane ou un inhibiteur de la TPH), mais plutôt la circulation maternelle, à partir de

laquelle la 5-HT serait captée par un transporteur sensible à la fluoxétine (Yavarone *et al.*, 1993a). La présence d'un transporteur à 5-HT sensible à la fluoxétine et de la 5-HT elle-même a aussi été démontrée chez l'embryon de souris au jour 12 (Lauder *et al.*, 1988). Le mécanisme de transport permettrait à la 5-HT maternelle d'atteindre l'embryon, via le placenta, et de réguler différents aspects du développement embryonnaire.

Par exemple, la 5-HT stimule de façon dose-dépendante la migration des cellules de la crête neurale en culture via les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2B} (Moiseiwitsch and Lauder, 1995; Choi *et al.*, 1997). De plus, la ritansérine inhibe la migration des cellules de la crête neurale et la prolifération de l'ecto-mésenchyme dans des embryons complets cultivés *in vitro* et cause, comme la sertraline et la fluoxétine, de sévères malformations cranio-faciales (Shuey *et al.*, 1992; Shuey *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 1997). Cette implication de la 5-HT dans le développement cranio-facial et dentaire est maintenant bien documentée et a été l'objet de nombreux articles de revues (Lauder, 1988; Weiss *et al.*, 1998; Moiseiwitsch, 2000; Buznikov *et al.*, 2001). La morphogénèse cardiaque est aussi régulée par la 5-HT, puisque la fluoxétine et la sertraline inhibent la prolifération du mésenchyme cardiaque, de l'endocarde et du myocarde dans les embryons complets (jours 9-12 post coitum) cultivés *in vitro* (Yavarone *et al.*, 1993b). Le récepteur 5-HT_{2B} a été identifié comme le récepteur régulant cet effet morphogénique de la 5-HT dans le coeur (Choi *et al.*, 1997), une fonction confirmée par la léthalité embryonnaire et la morphologie cardiaque du "knockout" du récepteur 5-HT_{2B} (Nebigil *et al.*, 2000). Une sensibilité de l'embryon de souris et d'autres tissus cultivés *in vitro* à des inhibiteurs spécifiques de la recapture de sérotonine (SSRIs) a été rapportée dans plusieurs études et suggère un rôle important de ce mécanisme dans les effets mitogéniques de la 5-HT (Shuey *et al.*, 1992; Yavarone *et al.*, 1993b; Buznikov *et al.*, 2001).

Objectifs

Le premier objectif de cette thèse était de caractériser l'implication potentielle de facteurs spermatiques dans la régulation calcique des ovocytes de souris. Les protéines oscilline et tr-kit ont été choisies comme candidats potentiels. En deuxième lieu, nous

voulions déterminer si la régulation calcique des ovocytes de souris pouvait être régulée par un RCPG exprimé à la surface des ovocytes et plus particulièrement le récepteur 5-HT_{2A}. Troisièmement, nous voulions savoir si le niveau des seconds messagers AMPc et Ca²⁺ des ovocytes et cellules du cumulus pouvait être modulé par la 5-HT via l'expression de récepteurs spécifiques. Finalement, nous voulions vérifier que les COCs contiennent la 5-HT et possèdent la capacité de la produire et de la recapter.

Dans une première étude, nous avons constaté que la protéine nommée oscilline, partiellement caractérisée chez le hamster, était présente chez la souris et possédait certaines caractéristiques fonctionnelles lui permettant d'agir comme facteur spermatique injecté provoquant l'activation ovocytaire lors de la fécondation. À cette fin, nous avons d'abord procédé à l'amplification par PCR, à l'aide d'oligonucléotides dégénérés, de l'homologue murin de l'oscilline. Nous avons ensuite cloné et séquencé les différents fragments composant la partie codante de l'oscilline de souris. Par la suite, nous avons procédé à une étude de l'expression de l'ARNm et de la protéine oscilline elle-même. Finalement, nous avons évalué sa localisation dans les spermatozoïdes de souris, de hamster et d'humain, par immunofluorescence indirecte, à l'aide d'un anticorps spécifique. En parallèle, nous avons aussi évalué l'expression tissulaire de l'ARNm et la localisation dans le spermatozoïde de la protéine tr-kit, l'autre facteur spermatique activateur potentiel, partiellement caractérisé chez la souris.

Dans une deuxième étude, nous avons examiné l'expression des récepteur 5-HT_{2A} 5-HT_{2B} et 5-HT₇ dans les ovocytes, embryons pré-implantatoires et cellules du cumulus de souris. Pour ce faire, nous avons vérifié l'expression de l'ARNm de ces trois récepteurs par RT-PCR et de la protéine elle-même par Western blot et immunofluorescence indirecte par microscopie confocale. Nous avons aussi déterminé la fonctionnalité de ces récepteurs en mesurant l'effet de la 5-HT sur le niveau des seconds messagers Ca²⁺ (à l'aide de la sonde fura-2 AM) et AMPc (par essai enzymo-immunologique) dans les ovocytes et les cellules du cumulus.

Dans une troisième étude, nous avons démontré la présence de 5-HT endogène, par immunofluorescence indirecte et microscopie confocale, dans les COCs et embryons pré-implantatoires, en plus de vérifier la capacité de ces cellules à synthétiser et à internaliser la 5-HT. Nous avons aussi vérifié l'expression de l'ARNm (par RT-PCR) et

la présence de la protéine (par Western blot) TPH et du transporteur à 5-HT dans les ovocytes, embryons pré-implantatoires et cellules du cumulus. Finalement, nous avons développé une technique d'immunofluorescence indirecte contre la 5-HT couplée à la microscopie confocale quantitative, pour évaluer la recapture de la 5-HT par les ovocytes et mettre ainsi en évidence certaines caractéristiques cinétiques du transporteur et de sa sensibilité aux SSRIs.

Chapitre 4 :

Articles originaux

4.1 Clonage, séquençage et analyse d'expression de la glucosamine-6-phosphate déaminase (GNPDA/oscilline) de souris.

Manuscrit publié dans la revue Molecular Reproduction and Development
en 2000, volume 56, numéro 3, pages 424-435

* Département d'Obstétrique-Gynécologie, Université de Montréal and Centre de Recherche du CHUM, Hôpital St-Luc, 264 boul. René-Lévesque Est, Montréal, Québec, Canada, H2X 1P1

¹ Send all editorial correspondence to François Dubé at above address

phone : (514) 281-2444 ext. 5819

fax : (514) 281-2492

[REDACTED] [REDACTED]

Abstract

It was reported that a hamster protein, called « oscillin », with a sequence related to that of an *E. coli* GNPDA, triggered Ca^{2+} oscillations in mammalian oocytes when introduced into their cytoplasm upon fertilization. Recently, it was shown that GNPDA/oscillin is ubiquitously expressed in rat tissues and that a recombinant hamster GNPDA/oscillin protein does not exhibit oscillin activity when injected into oocytes. In the mouse, the nature and role of such a GNPDA/oscillin is not known, but another candidate protein, tr-kit, has been proposed as a sperm factor causing oocyte activation. In order to clarify this issue, we have characterized the mouse homolog of hamster and human GNPDA/oscillin, and examined its expression along with that of tr-kit, in parallel. We report here the molecular cloning and sequencing of mouse GNPDA/oscillin which shows over 96% identity with the hamster and human homologs. Using specific primers, we performed an RT-PCR analysis to determine the tissue distribution of mouse GNPDA/oscillin mRNA. Unlike tr-kit mRNA which is expressed solely in mouse testis, GNPDA/oscillin mRNA is detected in unfertilized oocytes and in all tissues examined including testis, heart, thymus, liver, ovary, uterus, kidney, spleen and lung. The protein itself is also detected in all tissues examined by Western blots. Indirect immunofluorescence studies, using an antibody raised against hamster GNPDA, demonstrate that GNPDA is lost with the acrosome reaction of mouse spermatozoa, is localized in the equatorial and neck regions of the human spermatozoa and the post-acrosomal region of the hamster spermatozoa. Our results thus indicate that mouse GNPDA/oscillin, the homolog of hamster oscillin, unlike tr-kit, does not exhibit some of the required characteristics expected from a putative sperm-derived oocyte-activating factor.

Key words :

sperm factor ; oscillin ; spermatozoon ; egg activation ; tr-kit ; c-kit

Introduction

At fertilization, the spermatozoon initiates a sequence of events that leads to oocyte activation and embryonic development. The initial intracellular calcium $[Ca^{2+}]_i$ rise and the subsequent calcium oscillations trigger cortical granule exocytosis, resumption of meiosis, polar body extrusion, pronuclei formation and cleavage (Kline and Kline, 1992; Miyazaki *et al.*, 1993; Swann and Ozil, 1994; Tesarik *et al.*, 1994; Schultz and Kopf, 1995; Wu *et al.*, 1998). These events can be parthenogenetically induced by various stimuli that raise the $[Ca^{2+}]_i$ (Kline and Kline, 1992; Swann, 1994; Fissore *et al.*, 1998). The precise pattern and persistence of oscillations in $[Ca^{2+}]_i$ was shown to be important (Lawrence *et al.*, 1998; Ozil and Swann, 1995) and should be used to discriminate which candidate is(are) the true physiological(s) egg activator(s). These observations led to two main hypotheses to explain the changes in oocyte $[Ca^{2+}]_i$ seen at fertilization.

The first hypothesis suggests the presence of a sperm receptor on the oocyte plasma membrane. The activation of such a receptor, either a G protein-coupled receptor or tyrosine kinase receptor, would result in Ca^{2+} oscillations via the generation of the second messenger $InsP_3$ (Miyasaki, 1988; Fujiwara *et al.*, 1993; Schultz and Kopf, 1995). There is evidence that these receptor-messenger systems could be used at fertilization in mammalian eggs. First, the injection of inositol 1,4,5-trisphosphate ($InsP_3$) in mouse oocytes (Swann, 1994) or the activation of hamster oocyte with either external serotonin (Miyasaki *et al.*, 1990) or injected $GTP\gamma S$ (Miyasaki, 1988) triggers an intracellular calcium release. Second, changes in tyrosine phosphorylation of various proteins occur following fertilization in mouse oocytes (Endo *et al.*, 1986). However, the persistence and the pattern of the Ca^{2+} oscillations produced by these stimuli do not perfectly mimic those observed at fertilization (Miyazaki *et al.*, 1988; Swann, 1994). Even though there is evidence for the presence of several members of these two pathways in mammalian oocytes, their identity and role in mammalian egg activation is not clear (Schultz and Kopf, 1995; Dupont *et al.*, 1996).

The second hypothesis involves a soluble sperm factor that would be injected directly into the oocyte after fusion with the spermatozoon. Strong evidences are accumulating

in favor of this hypothesis for mammalian eggs since injection of either bovine, mouse, hamster or human oocytes with mammalian cytosolic sperm preparations can trigger repetitive calcium oscillations that closely mimic those seen at fertilization (Swann, 1990; Homa and Swann, 1994; Wu *et al.*, 1997). This sperm factor appears to be a protein or protein complex based on its high molecular mass and its sensitivity to proteases and heat (Swann, 1990; Wu *et al.*, 1997). Its expression seems restricted to sperm cells since injection of brain or liver preparations into oocytes do not trigger Ca^{2+} oscillations (Swann, 1990; Wu *et al.*, 1997). This sperm factor could even play a wider role in calcium signaling in mammalian cells since injections of sperm extracts into dorsal root ganglion neurons (Currie *et al.*, 1992), hepatocytes (Berrie *et al.*, 1996) and endothelial cells (Hogben *et al.*, 1998) also trigger Ca^{2+} oscillations in these cells. In addition, widely performed intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) procedures with human oocytes may lead to normal embryonic development and are accompanied by a normal series of Ca^{2+} oscillations and this, without any contact between the plasma membranes of gametes (Homa and Swann, 1994; Tesarik *et al.*, 1994).

Recently, the accumulation of observations in favor of the sperm factor hypothesis led to an intensified search to precisely identify this factor. A purified hamster sperm preparation, that produced normal Ca^{2+} oscillations when injected into mouse oocytes, was characterized and reported to be mainly constituted of a single active protein (Parrington *et al.*, 1996). This hamster protein, called « oscillin », was further shown to be a 289 amino acid-long polypeptide sharing 53% sequence identity with a glucosamine-6-phosphate deaminase (GNPDA) from *Escherichia coli* (Parrington *et al.*, 1996). They reported using Western blots, that this hamster protein was sperm-specific and, by indirect immunofluorescence, that it localized in the intracytoplasmic equatorial region of hamster, human and boar sperm (Parrington *et al.*, 1996). However, it was later observed, using Western and Northern blot analyses, that the rat homolog of hamster oscillin was ubiquitously expressed in rat tissues (Wolosker *et al.*, 1998). It was also reported that the recombinant hamster oscillin possessed a strong GNPDA activity but that it could not produce Ca^{2+} oscillations when injected into mouse oocytes (Wolosker *et al.*, 1998). Recently, the human homolog of the hamster GNPDA/oscillin

was identified (Shevchenko *et al.*, 1998) and also shown to have a strong GNPDA activity but no Ca^{2+} oscilligen activity (Wolny *et al.*, 1999).

In the mouse, it is not yet known whether a similar GNPDA/oscillin might regulate oocyte activation, but another candidate protein has been proposed to play such a role. This protein, called tr-kit, is a truncated C-terminal variant of the well known c-kit receptor (Rossi *et al.*, 1992), and is expressed exclusively at the end of the transcriptional phase of spermiogenesis (Albanesi *et al.*, 1996). Tr-kit is found in the midpiece and post-acrosomal region of the mouse sperm, and injecting into mouse oocytes a recombinant tr-kit or tr-kit mRNA can induce activation, pronucleus formation and a decrease in MAP kinase activity through phospholipase $\text{C}\gamma 1$ -mediated events (Sette *et al.*, 1997 ; Sette *et al.*, 1998).

Other recent hypotheses for egg activation include a receptor-trigger/sperm factor-oscillator mechanism (Tesarik and Mendoza, 1999), a two sperm factors mechanism (Wilding and Dale, 1997) and a multiple submembrane sperm components mechanism (Perry *et al.*, 1999). Finally, the implication of the second messenger InsP_3 in Ca^{2+} release at fertilization (Miyazaki *et al.*, 1992), which can be linked to any of the hypothesis presented here, has led to a search on the role of the InsP_3 -producing enzyme PLC in egg activation. A member of this family could be present in a hamster sperm extract that causes Ca^{2+} release in sea urchin egg homogenates (Jones *et al.*, 1998) and mouse eggs (Parrington *et al.*, 1999) or, alternatively, a PLC from the egg could be activated at fertilization even though a report showed that a SH2-domain mediated activation of the $\text{PLC}\gamma 1$ is not required at fertilization (Mehlmann *et al.*, 1998).

In light of these conflicting views regarding the nature of a sperm-derived oocyte-activating factor in diverse mammalian species, we decided to reexamine the various proposed possibilities, using the mouse which is one of the best known animal model in fertilization biology. We report here the cloning and sequencing of a mouse homolog of hamster GNPDA/oscillin that shows over 95% identity with the corresponding hamster and human proteins. An analysis of expression of both the protein and mRNA indicates that mouse GNPDA/oscillin is expressed in all tissues examined while the tr-kit mRNA is found only in the testis, as reported. We also show that GNPDA/oscillin is found in the acrosomal region of the mouse sperm, the post-acrosomal part of hamster sperm and

in the equatorial region of human sperm. The tr-kit protein localizes in the acrosomal region and connecting piece region of the mouse sperm. Our results thus confirm previous reports (Parrington et al., 1999; Wolosker et al., 1998; Wu et al., 1998) invalidating the possibility of mouse GNPDA/oscillin being an oocyte-activating factor involved in early fertilization events while tr-kit effectively fulfills some characteristics expected from such a factor.

Materials and methods

RNA isolation, RT-PCR, cloning and sequencing

Total RNA from different tissues of B6C3F1 mice (Charles River, St-Constant, Quebec, Canada) was extracted with guanidine-lithium chloride (Chirgwin *et al.*, 1979) and reverse transcribed with the enzyme Superscript II (Gibco-BRL, Burlington, Ontario, Canada) using an oligo dT as a primer. Testis cDNAs were then used in a polymerase chain reaction (*Taq* DNA polymerase, Gibco-BRL), of 35 cycles, consisting of a denaturation at 95 °C for 90 sec., primer annealing at 40 °C for 90 sec., and primer extension at 72°C for 3 min. with a final extension of 20 minutes. This PCR was performed using one sense degenerate primer (5'-ATGAAA/GC/TTIATIC/TTIGAG/ACAT/CTA-3') and one of two anti-sense primers (5'-GCA/GTCT/CCTA/GTCA/GCAIACA/GAAIAC-3' or 5'-CATIAG/AICCT/CTTA/GAAA/GTAT/CTTIAC-3') which were expected to yield amplified DNAs of 728 nucleotides (nt.) and 777 nt., respectively, based on the hamster oscillin sequence (EMBL X94699) and another related human sequence (EMBL D31766).

Obtained amplified DNAs were sequenced which allowed us to perform a 3' rapid amplification of cDNA ends to obtain the 3' end of the cDNA sequence. First, total RNA from testis was subjected to a reverse transcription using an oligo dT (5'-GCTAAGCTAGCG CTAAGAGCGGCCGCAAGC(T)₁₅-3') fused with a short « tail » of known nucleotides to serve as anchors. These cDNAs were then used in a nested PCR strategy using a sense primer (nt. 556-585, fig. 2) specific to the mouse cDNA of the GNPDA/oscillin and an anti-sense primer annealing to the 3' end anchor (5'-GCTAAGCTAGCGCTAAGAA-3'). One microliter of this 50 microliter reaction was then subjected to a second amplification with another specific sense primer (nt. 761-784, fig. 2) and another anchor-specific primer (5'-GCTAAGAGCGGCCGCAAG-3'). The PCR program, of 30 cycles with a hot start, consisted of denaturations of 90 sec. at 95°C, primer annealing of 90 sec. at 50°C, and primer extension of 3 min. at 72°C. The first 12 cycles followed a « touchdown » protocol where the annealing temperature was

gradually lowered from 61°C to 50°C and the last cycle had a primer extension time of 20 min (OSC-3, fig. 1).

To obtain the 5' end of the cDNA sequence, we used a mouse testis cDNA library (lambda gt11, Stratagene, La Jolla, California) in a half-nested PCR strategy using sequential amplifications with a sense primer specific to the phage arm (5'-TGACACCAGACCAACTGGTAATGG-3') and two anti-sense primers specific to the GNPDA cDNA (nt. 761-784 and nt. 556-585 respectively). The PCR program, of 35 cycles with a hot start, consisted of denaturations of 45 sec. at 95°C, primer annealing of 45 sec. at 57°C, and primer extension of 2 min. at 72°C (last primer extension of 20 minutes). The first PCR reaction (50 microliters) was loaded with 1 million phage with an initial denaturation of 10 min., and the second PCR reaction used 1 microliter from the first run (5'1, fig. 1).

Three other overlapping clones (fig. 1) were then produced by PCR to confirm the full sequence and check for possible errors due to the *Taq* polymerase. The first two were produced with testis cDNA in a standard PCR amplification (with the primers nt. 1101-1120 and 2170-2195 for OSC-5 and nt. 556-585 and 1238-1261 for OSC-6, fig. 2). The last one, OSC-7, was produced with the same strategy that gave 5'1.

All PCR products obtained were then cloned in pCRII (Invitrogen, Carlsbad, California) and sequenced on both strands using the T7 Sequenase v2.0 sequencing kit (Amersham Canada) or the sequencing service of the Laval University (Quebec, Canada).

Expression analysis

The cDNAs from various mouse tissues were used in a PCR reaction (with hot start) that consisted of 8 « touchdown » cycles of denaturation at 95°C for 30 sec., primer annealing at 75°C (-1°C/cycle) for 30 sec., and primer extension at 68°C for 90 sec. These cycles were followed by 22 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec., and primer annealing-extension at 68°C for 2 min., with a final extension of 10 min. One sense primer (nt. 106-131, fig. 2) and two anti-sense primers (nt. 556-585 and 761-784, fig. 2) were used to verify the expression of the GNPDA mRNA and the expression analysis of the tr-kit mRNA was performed with one sense specific primer (5'-

ATGGCTGTTGCTGTCTTTCCTTTTC-3', a.a. 1-9) and an anti-sense primer (5'-ACTGAAGCTTCAGGCATCTTCGTGCAGAGCAGGGGC-3', a.a. 194-202) containing a restriction site for Hind III (underlined). Primers specific for mouse β -actin (5'-GTGGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3' and 5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3', Clontech, Palo Alto, California) were used as positive controls. Negative controls were realized using the pairs of primers for GNPDA/oscillin or tr-kit on non-reverse transcribed RNA of each tissue to confirm the results. 10 μ L of each reaction was loaded on a 1,5% agarose gel stained with ethidium bromide.

Immunofluorescence analysis

Spermatozoa from the epididymis of B6C3F1 mice were collected, washed three times by centrifugation, and resuspended in Dulbecco's phosphate buffer saline (D-PBS). Spermatozoa were spotted on slides coated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ontario) and fixed/permeabilised in ethanol for 15 minutes at room temperature. The slides were then blocked with defatted 3% BSA (d-BSA, ICN Canada, Montreal, Quebec) in D-PBS for 1 hour at room temperature, before an overnight incubation at 4°C in a D-PBS/d-BSA solution containing, as primary antibodies, either an anti-GNPDA antibody (Wolosker *et al.*, 1998), diluted 1/500, or 5 μ g/mL of an antibody raised against the amino acids 958-976 of the c-kit human protein (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California), corresponding to the amino acids 184-202 of the mouse tr-kit (Rossi *et al.*, 1992), or stock rabbit serum IgG (Sigma) diluted 1/1500 as a control. After two washes in D-PBS/d-BSA the spermatozoa were incubated in D-PBS/d-BSA containing a Cy3-coupled goat anti-rabbit secondary antibody solution (Sigma), diluted 1/1000. After two washes in D-PBS, they were incubated in D-PBS containing 15 μ g/mL of fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC) *Pisum sativum* agglutinin (ICN Canada), washed two more times, and mounted with 50% glycerol. The same steps were followed with golden hamster sperm (Charles River) except that the anti-GNPDA was diluted 1/100 and the rabbit IgG at 1/300. For the human sperm, freshly ejaculated sperm was diluted in D-PBS and centrifuged for 10 min. at 650 g. The sperm was then allowed to swim-up in fresh D-PBS for 45 min. at 37°C, washed

two times in D-PBS, and spotted on poly-L-lysine-coated slides. Other procedures were similar to those used for mouse sperm.

Western blot analysis

Tissues from B6C3F1 mice were homogenized with a polytron in a buffer containing 25 mM MOPS, 15 mM MgCl₂, 2mM DTT and a protease inhibitor cocktail (Boehringer Mannheim Canada, Laval, Canada) containing aprotinin (0.1 μ M), bestatin (130 μ M), chymostatin (10 μ M), EDTA (1 mM), leupeptin (1 μ M), pepstatin (1 μ M) and phosphoramidon (300 nM). The homogenate was centrifuged 10 min. at 15000 g and the supernatants, diluted in sample buffer (Laemmli *et al.*, 1970), were loaded on a 12% SDS-PAGE gel, run at 200 V for 45 min. and then transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. The membrane was blocked with 3% milk and 0,05% Tween 20 in D-PBS for one hour at room temperature and then the blot was incubated with a 1/10000 dilution of the anti-GNPDA antibody overnight at 4°C. The detection was performed with the enhanced chemiluminescence assay (Amersham, Oakville, Canada).

Spermatozoa from the epididymis of either mouse or golden hamster, or freshly ejaculated human sperm, were collected in D-PBS and centrifuged at 650 g for 10 min. The spermatozoa were then allowed to swim-up in fresh D-PBS for 45 min. at 37°C, washed two times in D-PBS, and diluted in sample buffer. These solutions were sonicated, for 3 cycles of 45 sec. at 4°C, boiled for 10 min., and then centrifuged for 10 min. at 15000 g. The supernatants were later used for SDS-PAGE as for the mouse tissues.

Oocyte collection and RT-PCR analysis

B6C3F1 female mice were primed with 5 IU of pregnant mare's serum (PMS, Sigma) and induced to ovulate 46 hours later with 5 IU of human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma). Metaphase II mouse oocytes were recovered from the oviduct 16 hours after the hCG injection, in a M2 medium (Sigma) containing 10 mg/ml bovine testis hyaluronidase (Sigma) to remove cumulus cells. The oocytes were then transferred in a tube with a minimum of medium and kept at -80°C until mRNA isolation.

The mRNA of 100 mouse oocytes was isolated using the micro scale protocol of the Dynabeads mRNA DIRECT kit (Dynal Inc., Lake Success, NY). The mRNAs were reverse transcribed using the enzyme Superscript II (Gibco BRL) in a 20 μ L reaction at 42°C, for 45 minutes, to construct a cDNA library immobilized on beads, according to the manufacturer's specifications. The quality of the immobilized cDNA library was then verified by a standard PCR amplification using primers specific for β -actin. The first PCR run (50 microliters) was performed for one cycle using the cDNA beads, that were then removed following the second denaturation, and remaining cycles were performed with the supernatant. The PCR program, of 30 cycles with a hot start, consisted of a denaturation of 45 sec. at 95°C, primer annealing of 1 min. at 57°C, and primer extension of 2 min. at 72°C (last primer extension of 15 minutes). The second PCR run was performed with 1 microliter of products from the first amplification and the same PCR program. Two oligonucleotides (nt. 106-131 and nt. 556-585, fig. 2), specific to the mouse GNPDA/oscillin, were then used to verify the expression of GNPDA/oscillin mRNA in the oocytes. 10 μ L of each reaction was loaded on a 1,5% agarose gel stained with ethidium bromide.

Results

Cloning and sequencing of the mouse GNPDA/oscillin cDNA

We first wanted to identify the mouse homolog to the hamster oscillin. The various clones that allowed to obtain the full sequence are depicted in Figure 1. Mouse testis cDNAs were PCR-amplified using two pairs of degenerate primers, deduced from hamster and human GNPDA/oscillin sequences, and this yielded two overlapping DNA sequences of 728 and 777 nt. (OSC-1 and OSC-2, Fig. 1), spanning approximately 85% of the expected coding sequence. Based on this sequence, new oligonucleotides were synthesized and used in a 3' RACE strategy, to amplify a DNA fragment that included 1313 nt. of 3'-UTR and 149 nt. of coding sequence that overlapped with the OSC-2 fragment (OSC-3, Fig. 1). The 5' end of the coding sequence was obtained with another PCR strategy consisting in a half-nested PCR on a mouse testis cDNA library, that yielded a DNA clone of 585 nt., including 40 nt. of 5' non-coding sequence, overlapping with OSC-1 and OSC-2 (5'-1, Fig. 1). Finally, three other overlapping clones of 1094, 705 and 585 nt. (OSC-5, OSC-6 and OSC-7 respectively, Fig. 1) that span 2195 nt. were obtained to confirm the final sequence and make up for possible errors due to the *Taq* DNA polymerase (Fig. 1). The full sequence of mouse GNPDA/oscillin (Genbank, AF160355) is shown in Figure 2 and its longest open reading frame was determined as 870 nt. long with the first ATG at position 41. This sequence predicts a protein of 289 a.a. (Fig. 2), with a molecular mass of 32512 kDa. Comparisons of the mouse GNPDA/oscillin amino acid sequence (Blast program, NCBI) with other known sequences indicated that it is 97% similar (282/289) to the hamster GNPDA/oscillin (EMBL X94699) that was reported to have an oscillogen activity (Parrington *et al.*, 1996), and 96% (278/289) similar to the human GNPDA/oscillin (EMBL AF029914). Figure 3 shows a sequence alignment of the mouse protein with the hamster and human GNPDA/oscillins. The differences between the mouse sequence and the hamster sequence (7 a.a.) are all conservative and only 3 differences in amino acids (out of 11) between the mouse and human sequences are non-conservative (Fig. 3). These differences are scattered over the whole sequence and the high similarity scores establish this protein as the mouse homolog of the hamster and human proteins. High similarity

scores were also obtained with the *Caenorhabditis elegans* (68%), *Borrelia burgdorferi* (61%), *Haemophilus influenzae* (60%) and *Escherichia coli* (59%) GNPDAs.

Expression analysis of mouse GNPDA/oscillin mRNA and protein

Next, we wanted to verify whether the mouse homolog of hamster GNPDA/oscillin was expressed only in sperm and testes as it was first reported for the hamster (Parrington *et al.*, 1996) but not for the rat (Wolosker *et al.*, 1998). For so doing, we designed one sense oligonucleotide and two anti-sense oligonucleotides deduced from the mouse GNPDA/oscillin sequence (Fig. 2) and expected to yield, by, PCR, two amplified DNAs, respectively 479 nt. and 604 nt. long (see Materials and Methods).

Using cDNAs prepared from mouse testis RNA, in a PCR run, we detected amplified DNAs of expected sizes with both pairs of GNPDA/oscillin-specific primers, as well as with tr-kit-specific primers or β -actin-specific primers, as positive controls. No additional « contaminating » amplified DNAs were detected with all oligonucleotide pairs, and no amplified DNA could be detected in negative controls, thus validating the specificity of these oligonucleotides (Fig. 4).

Therefore, the same oligonucleotides were used to determine whether mouse GNPDA/oscillin or tr-kit mRNAs were expressed in other mouse tissues (Fig. 5). Our RT-PCR expression analysis shows that the mouse GNPDA/oscillin mRNA is expressed in all nine tissues examined including heart, liver, ovary, lung, spleen, kidney, testis, thymus and uterus (Fig. 5 panel A and B). These results are similar to those obtained by Northern blots with several rat tissues (Wolosker *et al.*, 1998), and thus confirm that the mouse GNPDA/oscillin mRNA is ubiquitously expressed in most, if not all, tissues. This observation does not fit one condition required for a sperm-derived oocyte-activating factor, e.g. to be restricted to sperm cells. In parallel we investigated the expression of tr-kit mRNA, another candidate activator of mammalian oocytes, reported to be expressed solely in postmeiotic haploid germ cells (Sorrentino *et al.* 1991). Our results indeed confirm that tr-kit mRNA is expressed solely in the testis (Fig. 5 panel C). Finally, we were also able to detect GNPDA/oscillin mRNA (Fig. 6), using unfertilized oocyte.

We then used a polyclonal anti-hamster GNPDA antibody (provided by Dr. Herman Wolosker, John's Hopkins University) in a Western blot analysis on different mouse tissues (Fig. 7). The antibody recognizes an antigen of approximately 35 kDa, the expected size of mouse GNPDA/oscillin, in all tissues including brain, heart, liver, ovary, lung, spleen, kidney and testis (Fig. 7a), confirming the ubiquity of expression of the protein itself, in addition to its mRNA.

A Western blot analysis on protein preparations from mouse, hamster and human sperm was also conducted to verify the specificity of the antibody. As shown in figure 7b, the antibody recognizes a single band of approximately 35 kDa in sperm of all species.

Some additional higher molecular weight bands were occasionally seen in some of the tissues used (e.g. kidney, lane 2, Fig. 7a) and presumably correspond to unknown proteins sharing a common epitope with GNPDA/oscillin. However, sperm extracts revealed only a single band of approximately 35 kDa which was the only one detected in all tissues.

Localization of GNPDA/oscillin and tr-kit in the hamster, human and mouse sperm

The specificity of the anti-GNPDA antibody permitted us to perform an indirect immunofluorescence localization of the protein in mouse, hamster and human sperm (Fig. 8). Using this antibody, we were able to localize the protein in mouse spermatozoa as exclusively associated with the acrosomal region (Fig. 8b). Omitting the first antibody or using rabbit IgG instead of GNPDA antibody, as negative controls, resulted in total absence of staining (not shown). We also used a *Pisum sativum* lectin as an FITC-conjugate that labels exclusively acrosome-intact spermatozoa with little or no binding to spermatozoa having undergone spontaneous acrosome reaction (Cross *et al.*, 1986). Using this marker of intact acrosomes, we observed that anti-GNPDA labeling was strictly associated with a parallel positive labeling by the FITC-conjugated lectin, while acrosome-reacted spermatozoa, as determined by an absence or a very weak labeling by the lectin, were also negative for anti-GNPDA (Fig. 8a, b and c). Moreover, using paraformaldehyde-fixed spermatozoa, a strong labeling of the acrosome region could be seen only if they had been permeabilized with Triton X-100 prior to the

incubation with the anti-GNPDA antibody (not shown). These observations strongly suggest an intracellular localization for mouse GNPDA/oscillin and that it is lost after the acrosome reaction.

It has been reported (Parrington *et al.*, 1996 ; also shown for the human by Wolny *et al.*, 1999) that the boar, hamster and human GNPDA/oscillin localized to the equatorial segment of their respective spermatozoon. We also localized GNPDA/oscillin in the hamster and human sperm. As reported, a strong staining occurred in the equatorial region of the human sperm (Fig. 9b), with no staining when using only the secondary antibody or a rabbit IgG control as first antibody (not shown). However, the staining observed with the anti-GNPDA antibody on the hamster sperm indicated a strong labeling of the post-acrosomal region of the head, and on the tip of the acrosome (Fig. 9d) unlike previous studies reporting an equatorial localization (Parrington *et al.*, 1996). The negative controls, second antibody only or rabbit IgG as first antibody, had no staining (not shown).

We also verified, in parallel, the localization of the tr-kit protein in the mouse spermatozoon. It has been reported that tr-kit could be found in spermatid residual bodies and in the mid-piece and post-acrosomal region of the mouse mature spermatozoon (Albanesi *et al.*, 1996 ; Sette *et al.*, 1997). We conducted an indirect immunofluorescence analysis, using an affinity purified anti-c-kit antibody recognizing the C-terminal part of the protein, and, unlike previous reports (Albanesi *et al.*, 1996 ; Sette *et al.*, 1997), we found tr-kit to be present in the acrosomal region and in the connecting piece region of the mouse sperm (Fig. 8e). We verified, using the lectin *Pisum sativum*, if the loss of the acrosome resulted in a parallel loss of staining with the anti-c-kit in these regions. The loss of the acrosome, as indicated by an absent or weak labeling using the lectin, greatly reduced the staining over the acrosomal region (Fig. 8d, e and f) while the connecting piece labeling was maintained. Paraformaldehyde-fixed spermatozoa needed to be permeabilized with Triton X-100 to observe a labeling of the acrosome and the connecting piece region, suggesting an intracellular localization of this protein.

Discussion

Numerous results suggest an important role for a sperm factor at fertilization. Indeed, the injection of sperm preparations can generate the initial Ca^{2+} wave and the following Ca^{2+} rises that lead to oocyte activation (Jones *et al.*, 1998; Swann, 1990 ; Wu *et al.*, 1997 ; Wolosker *et al.*, 1998). The exact nature of the sperm factor or the sperm factors is not known and clear evidences of its involvement in natural fertilization are still missing. Some candidates have been proposed in recent years to play the role of sperm factor (Parrington *et al.*, 1996 ; Sette *et al.*, 1997 ; Kimura *et al.*, 1998). One of these potential sperm factors, the oscillin, was first purified by submitting hamster sperm proteins through successive chromatographic columns (Parrington *et al.*, 1996). These fractions were injected into mouse oocytes and assessed for a Ca^{2+} -oscillating activity. This technique permitted to purify a protein with such an oscillogen activity, to sequence it, and to raise a monoclonal antibody against it. The sequence of oscillin showed no similarity with known cellular messengers but was 53% similar to the *Escherichia coli* GNPDA (Parrington *et al.*, 1996). The monoclonal antibody was used in a Western blot analysis that suggested the sperm specificity of the protein and, in an immunofluorescence assay indicating that the protein localized in the equatorial region of hamster, human and boar sperm. This region of the sperm is the site of fusion between gametes (Yanagimachi, 1994), and is thus a proper localization for an injected sperm-derived oocyte-activating factor. The hamster and human oscillins were recently identified as GNPDA, since they can convert glucosamine-6-phosphate into fructose-6-phosphate, and experiments showed that chromatography-purified GNPDA, recombinant GNPDA or GNPDA mRNA were not able to induce Ca^{2+} oscillations when injected into oocytes (Parrington *et al.*, 1999; Wolosker *et al.*, 1998 ; Wolny *et al.*, 1999). It was also shown that the rat homolog is ubiquitously expressed both at the mRNA and protein levels (Wolosker *et al.*, 1998).

In order to clarify this issue, we decided to verify, with the mouse, whether GNPDA/oscillin would fulfill some of the basic characteristics expected from a soluble sperm factor. First, the sperm factor is expected to be well conserved among the different mammalian species. Indeed, injection of a sperm factor prepared from boar or

hamster sperm can induce Ca^{2+} oscillations in mouse oocytes and other experiments using spermatozoa and oocytes from hamster, human or cow support the notion that this sperm factor has a universal role across many mammalian species (Swann, 1990 ; 1992 ; Homa and Swann, 1994 ; Wu *et al.*, 1997). The sequence of mouse GNPDA/oscillin is very similar to the *Escherichia coli* GNPDA (59%), but, more importantly, it is 97% and 96% similar to the hamster and human GNPDA/oscillins. This high similarity unambiguously confirms our sequence as the mouse homolog and is in agreement with the expected high degree of conservation among mammalian sperm factors.

Second, the sperm factor should be sperm-specific since injecting brain or liver extracts into oocytes does not cause Ca^{2+} oscillations (Swann, 1990 ; Wu *et al.*, 1997). In order to verify this, we conducted RT-PCR and Western blot analyses revealing that both mouse GNPDA/oscillin mRNA and protein are expressed in a variety of tissues. This ubiquity of expression was also reported for the rat homolog by Northern and Western blots (Wolosker *et al.*, 1998). The ubiquity of the GNPDA/oscillin expression does not fulfill the sperm-specificity expected from a sperm factor.

Third, a sperm factor is expected to localize in a sperm region that would allow its transfer into the oocyte at fertilization. It was previously reported that most of GNPDA/oscillin was found in the equatorial region of boar, hamster, human, mouse and pig sperm (Parrington *et al.*, 1996 ; Swann and Lai, 1997 ; Wolny *et al.*, 1999). Our results with the mouse strongly differ from these initial observations since GNPDA/oscillin localizes essentially within the acrosomal region of the sperm and the protein is thus presumably lost prior to gamete fusion. This localization was confirmed using the lectin *Pisum Sativum* which binds to the acrosome content. Indeed, when spermatozoa were scored acrosome-lost (e.g. weak or no staining with the lectin) the GNPDA/oscillin staining was also absent. The protein is thus within the head in the acrosomal region since ethanol fixation/permeabilization or Triton X-100 permeabilization after fixation with paraformaldehyde was needed to observe the staining. The localization of the GNPDA/oscillin in the acrosomal region cannot be precisely identified, since it would require transmission electron microscopy, but the sequence obtained from testis cDNA does not code for a signal peptide that would target the protein inside the acrosome. We infer from these informations that mouse

GNPDA/oscillin cannot be transferred within the oocyte at fertilization. We also verified the GNPDA/oscillin localization in human sperm and found it to be localized in the equatorial and the neck region. The neck region staining has only been reported by one group and they hypothesized that it was perhaps due to a cross reaction with unidentified sperm proteins (Wolny *et al.*, 1999). We also observed that the neck staining was often less intense than the equatorial staining but was nevertheless seen in all experiments. Since our antibody recognizes only one protein in Western blot, we believe this staining to be specific and conclude that GNPDA/oscillin is also present in the neck region of the human sperm. With the hamster sperm, we observed a strong staining of the post-acrosomal part of the head and a weaker staining at the tip of the acrosome. This localization is different from the equatorial localization first reported with a monoclonal antibody directed against the hamster protein (Parrington *et al.*, 1996). The reason for this discrepancy is unclear but, as mentioned, cannot be attributed to any improper specificity of the antibody we used. Anyhow, this localization of GNPDA/oscillin within the hamster sperm might still fit the possibility of its being injected in the oocyte at fertilization. It is difficult however to explain the observed differences in the localization of the protein in the different species studied and what could be the role of the GNPDA/oscillin in the mammalian sperm. Even though our results with hamster and human sperm fit with the « injectable localization » in the spermatozoon, the acrosomal localization of GNPDA/oscillin in the mouse spermatozoon is irreconcilable with this requirement.

Our results on tr-kit mRNA expression analysis are in agreement with previous observations and confirm the sperm specificity of tr-kit (Sorrentino *et al.*, 1991). The immunolocalization of this protein in the acrosomal region and in the connecting piece region of the mouse spermatozoon is, however, different from what was reported (Sette *et al.*, 1997). Indeed, the tr-kit protein was first localized in the midpiece and cytoplasmic droplet of the flagellum (Sette *et al.*, 1997). The potential « oocyte activating » role of this protein suggests a non-acrosomal localization of tr-kit if it is to be injected in the oocyte at fertilization. The acrosomal localization of tr-kit reported here does not support the possibility of its being injected within the oocyte and it should be noted that the 12 a.a. specific to tr-kit have a hydrophobicity pattern compatible with

a signal cleave/signal anchor sequence (Rossi *et al.*, 1992) which could mean that the protein might be targeted in the acrosome. However, some staining was also seen in the connecting piece region, a localization allowing to speculate that the protein is transferred to the oocyte at fertilization. It should be noted, however, that the anti tr-kit antibody used was raised against a C-terminal region of the protein shared by both c-kit and tr-kit. It is generally admitted, by most workers, that the expression of c-kit mRNA or c-kit protein in the male germ cells is restricted to the spermatogonia and early spermatocytes while the later spermatocytes and spermatids do not express it (Manova *et al.*, 1990, Yoshinaga *et al.*, 1991, Sorrentino *et al.*, 1991, Rossi *et al.*, 1992, Albanesi *et al.*, 1996). In strong contrast with this view, it was recently reported that the c-kit protein is present in the acrosomal granules of mouse round spermatids and the acrosome of testicular spermatozoa (Sandlow *et al.*, 1996). It was further suggested (Feng *et al.*, 1997) that the c-kit receptor is involved in the acrosome reaction and that acrosome-reacted sperm lost their immunoreactivity to anti-c-kit, as indicated by Western blotting. If these latter observations prove correct, it would mean that the staining observed in our study might be due not only to tr-kit but also to c-kit, or both. Further studies will be required to clarify these issues but, nevertheless, our results remain in agreement with the possibility for tr-kit to be the effective oocyte-activating sperm factor. In contrast, mouse GNPDA/oscillin does not fulfill at least two conditions required for a sperm factor. Its ubiquitous expression in various mouse tissues, including the oocytes, and its acrosomal localization in the spermatozoon confirm that GNPDA/oscillin does not play the role of sperm factor at fertilization.

Acknowledgments

We thank Suzanne Charland for her technical assistance with the immunofluorescence studies and for human sperm preparation, Michel Ste-Marie for his assistance in collecting oocytes, Dr. Guylain Boissonneault for sharing his mouse testis cDNA library, and Dr. Herman Wolosker for providing us with his anti-GNPDA antibody. This work was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC-Canada) grant to F.D.

References

- Albanesi C, Geremia R, Giorgio M, Dolci S, Sette C, and Rossi P. 1996. A cell- and developmental stage-specific promoter drives the expression of a truncated c-kit protein during mouse spermatid elongation. *Development* 122 : 1291-1302.
- Berrie CP, Cuthbertson KSR, Parrington J, Lai FA, and Swann K. 1996. A cytosolic sperm factor triggers calcium oscillations in rat hepatocytes. *Biochem J* 313 : 369-372.
- Chirgwin JN, Przbyla AE, MacDonald JR, and Rutter WJ. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonucleases. *Biochemistry* 18 : 5294-5299.
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, and Hanson FW. 1986. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gam Res* 15 : 213-226.
- Currie KPM, Swann K, Galione A, and Scott RH. 1992. Activation of Ca^{2+} -dependent currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones by a sperm factor and cyclic ADP-ribose. *Mol Biol Cell* 3 : 1415-1425.
- Dupont G, McGuinness O, Johnson MH, Berridge MJ and Borgese F. 1996. Phospholipase C in mouse oocytes : characterization of isoforms and their possible involvement in sperm-induced Ca^{2+} spiking. *Biochem J* 316 : 583-591.
- Endo Y, Kopf GS, and Schultz RM. 1986. Stage-specific changes in protein phosphorylation accompanying meiotic maturation of mouse oocytes and fertilization of mouse eggs. *J Exp Zool* 239 : 401-409.
- Feng H, Sandlow JI, and Sandra A. 1997. Expression and function of the c-kit proto-oncogene protein in mouse sperm. *Biol Reprod* 57 : 194-203.

Fissore RA, Gordo AC, and Wu H. 1998. Activation of development in mammals : is there a role for a sperm cytosolic factor? *Theriogenology* 49 : 43-52.

Fujiwara T, Nakada K, Shirakawa H, and Miyazaki S. 1993. Development of inositol trisphosphate-induced calcium release mechanism during maturation of hamster oocytes. *Dev Biol* 156 : 69-79.

Hogben M, Parrington J, Shevchenko V, Swann K, and Lai FA. 1998. Calcium oscillations, sperm factors and egg activation at fertilization. *J Mol Med* 76 : 548-554.

Homa ST, and Swann K 1994. A cytosolic sperm factor triggers calcium oscillations and membrane hyperpolarizations in human oocytes. *Hum Reprod* 9 : 2356-2361.

Jones KT, Cruttwell C, Parrington J and Swann K. 1998. A mammalian sperm cytosolic phospholipase C activity generates inositol trisphosphate and causes Ca^{2+} release in sea urchin egg homogenates. *FEBS Lett* 437 : 297-300.

Kimura Y, Yanagimachi R, Kuretake S, Bortkiewicz H, Perry ACF, and Yanagimachi H. 1998. Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol Reprod* 58 : 1407-1415.

Kline D, and Kline JT. (1992). Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 149 : 80-89.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.

Lawrence Y, Ozil JP and Swann K. 1998. The effects of a Ca^{2+} chelator and heavy-metal-ions chelators upon Ca^{2+} oscillations and activation at fertilization in mouse eggs suggest a role for repetitive Ca^{2+} increases. *Biochem J* 335 : 335-342.

Manova K, Nocka K, Besmer P, and Bachvarova RF. 1990. Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development* 110 : 1057-1069.

Mehlmann LM, Carpenter G, Rhee SG and Jaffe LA. 1998. SH2 domain-mediated activation of phospholipase C γ is not required to initiate Ca²⁺ release at fertilization of mouse eggs. *Dev Biol* 203 : 221-232.

Miyasaki S. 1988. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate-induced calcium and guanine nucleotide protein-mediated periodic calcium rises in golden hamster eggs. *J Cell Biol* 106 : 345-353.

Miyasaki S, Katayama Y, and Swann K. 1990. Synergistic activation by serotonin and GTP analogue and inhibition by phorbol ester of cyclic Ca²⁺ rises in hamster eggs. *J Phys* 426 : 209-227.

Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, and Honda Y. 1993. Essential role of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ release channel in Ca²⁺ waves and Ca²⁺ oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol* 158 : 62-78.

Ozil JP, and Swann K. 1995. Stimulation of repetitive calcium transients in mouse eggs. *J Phys* 483 : 331-346.

Parrington J, Jones KT, Lai FA and Swann K. 1999. The soluble sperm factor that causes Ca²⁺ release from sea-urchin (*Lytechinus pictus*) egg homogenates also triggers Ca²⁺ oscillations after injection into mouse eggs. *Biochem J* 341 : 1-4.

Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, and Lai FA. 1996. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 379 : 364-368.

Perry ACF, Wakayama T and Yanagimachi R. 1999. A novel trans-complementation assay suggests full mammalian oocyte activation is coordinately initiated by multiple, submembrane sperm components. *Biol Reprod* 60 : 747-755.

Rossi P, Marziali G, Albanesi C, Charlesworth A, Geremia R, and Sorrentino V. 1992. A novel c-kit transcript, potentially encoding a truncated receptor, originates within a kit gene intron in mouse spermatids. *Dev Biol* 152 : 203-207.

Sandlow JJ, Feng HL, Cohen MB, and Sandra A. 1996. Expression of c-kit and its ligand, stem cell factor, in normal and subfertile human testicular tissue. *J Androl* 17 : 403-408.

Schultz RM, and Kopf GS. 1995. Molecular basis of mammalian egg activation. *Cur Top In Dev Biol* 30 : 21-62.

Sette C, Bevilacqua A, Bianchini A, Mangia F, Geremia R, and Rossi P. 1997. Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *Development* 124 : 2267-2274.

Sette C, Bevilacqua A, Geremia R, and Rossi P. 1998. Involvement of phospholipase C γ 1 in mouse egg activation induced by a truncated form of the c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *J Cell Biol* 142 : 1063-1074.

Shevchenko V, Hogben M, Ekong R, Parrington J, and Lai, FA. 1998. The human glucosamine-6-phosphate deaminase gene : cDNA cloning and expression, genomic organization and chromosomal localization. *Gene* 216 : 31-38.

Sorrentino V, Giorgi M, Geremia R, Besmer P, and Rossi P. 1991. Expression of the c-kit proto-oncogene in the murine male germ cells. *Oncogene* 6 : 149-151.

Swann K. 1990. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development* 110 : 1295-1302.

Swann K. 1992. Different triggers for calcium oscillations in mouse eggs involve a ryanodine sensitive calcium store. *Biochem J* 287 : 79-84.

Swann K. 1994. Ca^{2+} oscillations and sensitization of Ca^{2+} release in unfertilized mouse eggs injected with a sperm factor. *Cell Calc* 15 : 331-339.

Swann K, and Lai FA. 1997. A novel signalling mechanism for generating Ca^{2+} oscillations at fertilization in mammals. *Bioessays* 19 : 371-378.

Tesarik J, Sousa M, and Testart J. 1994. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 9 : 511-518.

Wilding M and Dale B. 1997. Sperm factor: what is it and what does it do? *Mol Hum Reprod* 3 : 269-273.

Wolny YM, Fissore RA, Wu H, Reis MM, Colombero LT, Ergün B, Rosenwaks Z, and Palermo GD. 1999. Human glucosamine-6-phosphate isomerase, a homologue of hamster GNPDA, does not appear to be involved in Ca^{2+} release in mammalian oocytes. *Mol Reprod and Dev* 52 : 277-287.

Wolosker W, Kline D, Bian Y, Blackshaw S, Cameron AM, Fralich TJ, Schnaar RL, and Snyder SH. 1998. Molecularly cloned mammalian glucosamine-6-phosphate deaminase localizes to transporting epithelium and lacks GNPDA activity. *FASEB J* 12 : 91-99.

Wu H, He CL, and Fissore RA. 1997. Injection of a porcine sperm factor triggers calcium oscillations in mouse oocytes and bovine eggs. *Mol Reprod and Dev* 46 : 176-189.

Wu H, He CL, and Fissore RA. 1998. Injection of a porcine sperm factor induces activation of mouse eggs. *Mol Reprod and Dev* 49 : 37-47.

Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In Knobil E and Niell D, editor. *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition. New York : Raven Press. pp. 189-317.

Yoshinaga K, Nishikawa S, Ogawa M, Hayashi SI, Kunizada T, Fujimoto T, and Nishikawa SI. 1991. Role of c-kit in mouse spermatogenesis : identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development* 113 : 689-699.

Figures

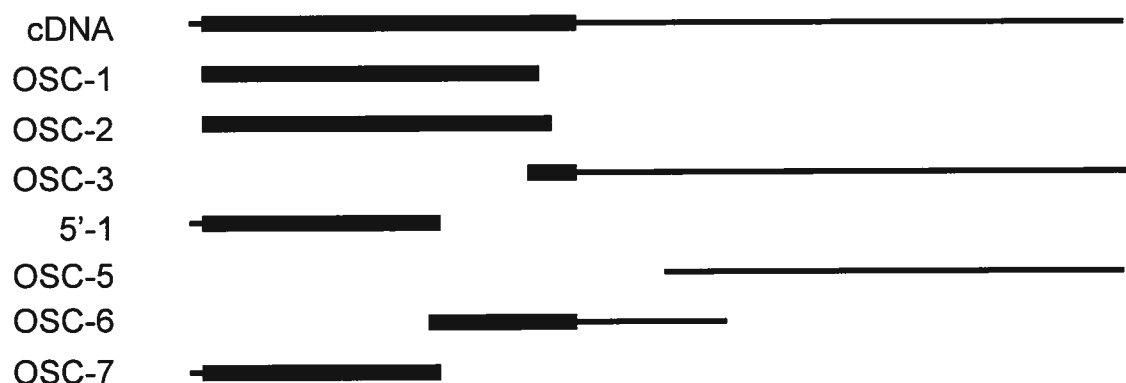


Figure 1 : Representation of the different mouse GNPDA/oscillin cDNA clones sequenced. The OSC-1 (728 nt.) and OSC-2 (777 nt.) clones were the first obtained by RT-PCR using testis cDNA with degenerate oligonucleotides. The OSC-3 (1462 nt.) clone was obtained with a 3' RACE strategy using testis cDNA. The 5'1 and OSC-7 clones (585 nt.) were obtained with a half-nested PCR strategy using a testis cDNA library. The OSC-5 (1094 nt.) and OSC-6 clones were obtained by regular RT-PCR using testis cDNA. All these clones were sequenced on both strands. The coding region is represented with broader bars.

```

1  CTGTAGCTGCTGCAGCCGCGGGAAGCCTGCGAGTCTAGCG
   M  K  L  I  I  L  E  H  Y  S  Q  A  S  E  W  A  A  K  Y  I
41  ATG AAG CTC ATT ATC CTG GAA CAC TAT TCC CAG GCC AGT GAG TGG GCG GCC AAG TAT ATT
   R  N  R  I  I  Q  F  N  P  G  P  D  K  Y  F  T  L  G  L  P
101  AGG AAC CGT ATC ATC CAG TTT AAC CCA GGG CCT GAC AAG TAC TTC ACC CTG GGG CTC CCC
   T  G  S  T  P  L  G  C  Y  Q  K  L  I  E  Y  Y  K  N  G  D
161  ACT GGG AGC ACC CCG CTT GGC TGC TAC CAG AAG CTG ATC GAG TAC TAT AAG AAT GGG GAC
   L  S  F  Q  Y  V  K  T  F  N  M  D  E  Y  V  G  L  P  R  D
221  CTG TCC TTT CAA TAT GTG AAA ACC TTC AAC ATG GAC GAG TAT GTG GGT CTT CCT CGA GAC
   H  P  E  S  Y  H  S  F  M  W  N  N  F  F  K  H  I  D  I  H
281  CAC CCA GAG AGT TAC CAC TCC TTC ATG TGG AAT AAT TTC TTC AAG CAC ATT GAC ATC CAC
   P  E  N  T  H  I  L  D  G  N  A  A  D  L  Q  A  E  C  D  A
341  CCT GAA AAC ACC CAC ATT TTG GAT GGA AAT GCG GCT GAC CTG CAG GCC GAG TGT GAC GCC
   F  E  E  K  I  Q  A  A  G  G  I  E  L  F  V  G  G  I  G  P
401  TTT GAG GAG AAG ATC CAG GCT GCC GGA GGG ATC GAA CTC TTT GTC GGA GGC ATT GGC CCC
   D  G  H  I  A  F  N  E  P  G  S  S  L  V  S  R  T  R  V  K
461  GAT GGA CAC ATT GCC TTC AAT GAG CCA GGC TCC AGC CTG GTG TCC AGG ACC CGT GTG AAG
   T  L  A  M  D  T  I  L  A  N  A  R  F  D  G  D  L  A  K
521  ACT CTG GCT ATG GAC ACC ATC CTG GCC AAC GCT AGG TTC TTT GAT GGT GAT CTT GCC AAG
   V  P  T  M  A  L  T  V  G  V  G  T  V  M  D  A  K  E  V  M
581  GTG CCC ACC ATG GCC CTG ACA GTG GGG GTC GGC ACT GTC ATG GAT GCT AAA GAG GTG ATG
   I  L  I  T  G  A  H  K  A  F  A  L  Y  K  A  I  E  E  G  V
641  ATC CTC ATC ACA GGC GCT CAG AAC GCC TTC GCT CTG TAC AAA GCC ATC GAG GAG GGC GTG
   N  H  M  W  T  V  S  A  F  Q  Q  H  P  R  T  V  F  V  C  D
701  AAC CAC ATG TGG ACG GTG TCC GCC TTT CAG CAG CAC CCC CGC ACT GTG TTT GTG TGT GAC
   E  D  A  T  L  E  L  K  V  K  T  V  K  Y  F  K  G  L  M  L
761  GAG GAC GCC ACC TTG GAA CTA AAA GTG AAG ACA GTC AAA TAT TTC AAA GGT TTA ATG CTT
   V  H  N  K  L  V  D  P  L  Y  S  I  K  E  K  E  I  Q  K  S
821  GTT CAT AAC AAG CTG GTG GAC CCC CTG TAC AGT ATC AAG GAG AAG GAA ATT CAG AAA AGC
   Q  S  A  K  K  P  Y  S  D
881  CAA TCT GCT AAG AAG CCA TAC AGT GAC TAG
911  CCTGTGACCGACATGGTATTTCAGTACCTCAGAGGGACAGGCAGGTCTTTCCGAAAGTCTCTGTAGGAGAGAGAGTAGGA
991  TTAAGGAGTTTGGGCTATGGAGAACATT
1071 GTTGATTATAATTTTCTCCTTCTTTTTCAGTACTGGGGCTGAACCTGGGGCCTTGACATGCCAAGGAGGTGCCTTGC
1151 TAACTGAGCTATGTCCCAACTTCTGCCCCCTTTTCATAATGGTTTTGTAAACCATCCGAAGTCTCCATCACTGACTGTAA
1231 TTATATTCTTCTGCCCCCTATGCACATGGGCAGCACACGCCCGTCGAGAACTCCTGTCTGTATGTGTGCTTTTCTAGAGT
1311 TGGCAGGGATTAGGGCTTGTGCACTTTGGACATAACCTTTCTGGAGACTTGAGATCCCCCTCTTCTGCCAGCCTTCCCACT
1391 GAGAATTTTCATTTTAAAGAATACACTTCCAGAACTTGAATTATGCACAAGGAAGCAGCCCTTCCTGCCAGAACCAAGAA
1471 CCTGGGGGAGAAGCCTGTCCCTTGTCCCATTTGTGTGGATTGTCTTTCTGTTGTCTAGTAGCTAGCCTTTCTGTAAACAG
1551 GCCTTCTGGGCATGTGGGGCTAAGATGGCTTTTACAGGTAAGCTCAAAGCTTCAAAGGCCAGCCTTGTCTTGTCTCTC
1631 TCAAGATTCCAACAAGAGAAAAGTGGAAGGCCCTCCTGCCTGAGCTCTGTTTTCTCAACAGATTCTTACACACTCCCTA
1711 GTAAGGAGATCCGCGTGGGTACACAGACACGCTATGATTTTCAGTGTTTTACCCAAGGTGGGGAGCTGACATCTGCACATG
1791 CGCTGTGCTCTGCGGCTTCTCAGAGCTGAGTGCCAAGATTATACACGCTACTGCTCTCTCCTCGCTTAACCTCACCCAG
1871 CACTCCACCTTCGGGTTTATATCCTCTGTCTCAGCATCAGAACTAAACCTTCACCCCCCTGTCTTCTCAGGCTCCCTT
1951 CCCAGGCTCCTCTGCTTGGCCTTGTCTTATCTCTCTGCTCTGTGGAGTAGTCGCTGCCTCCTCTCCGTCTTGTGCC
2031 TGTCTGAAGCTAGAGCTGCCTATTTCCAGGAGAGGTCTTTTCAAGAACATTGCCAGGCCCTCCAGAAGTACTGTGTTTGG
2111 TACCAGCATTTGTTTGTAGTTTTTATATGTGATTGTGCTATTGTTCTGTGTTAAGCTAATGGATCAATGGACTTGTTACA
2191 ATGTG

```

Figure 2 : Nucleotide and deduced amino acid sequence of mouse GNPDA/oscillin.

The 2195 nt. sequenced includes 40 nt. of 5'-untranslated region, 870 nt. of coding sequence and 1285 nt. of 3'-untranslated region. The ORF starts at position 41 and encodes a 289 amino acid protein. This sequence has been deposited in the GenBank Database under the accession number AF160355.

Figure 3 : Sequence alignment of mouse GNPDA/oscillin with the hamster and human GNPDA/oscillins. The mouse sequence is 97% identical to the hamster protein and 96% identical to the human protein. The « + » and « : » signs represent, respectively, conservative and non-conservative differences.

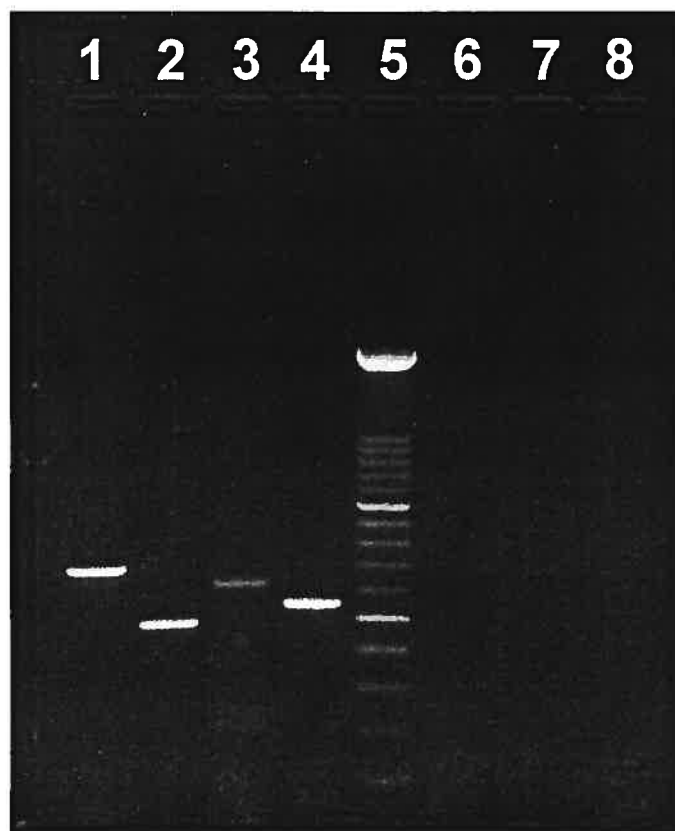


Figure 4 : GNPDA/oscillin mRNA expression in mouse testis. PCR products obtained from an amplification on mouse testis cDNA with two primer pairs specific for GNPDA/oscillin (lane 1, 604 nt. and lane 2, 479 nt.), two specific primers for tr-kit (lane 3, 640 nt.) and two specific primers for β -actin (lane 4, 540 nt.). Lane 5, 6, 7 were loaded with PCR products obtained from an amplification performed on non reverse transcribed RNA with GNPDA/oscillin primers pair 1, pair 2 and tr-kit primers, respectively. Lane M was loaded with a 100 bp ladder.

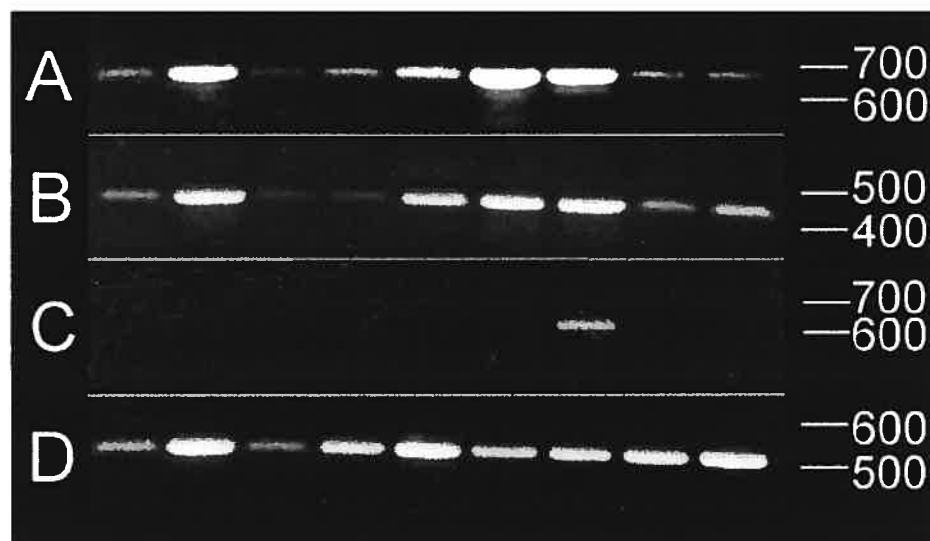


Figure 5 : GNPDA/oscillin mRNA expression in mouse tissues. PCR products obtained from an amplification using cDNAs from different mouse tissues with primers specific for GNPDA/oscillin (panel A and B), tr-kit (panel C) and β -actin (panel D). The tissues studied were (lanes 1-9) : heart, liver, ovary, lung, spleen, kidney, testis, thymus and uterus. Proper negative controls (not shown) did not reveal any band, as in Fig. 4.

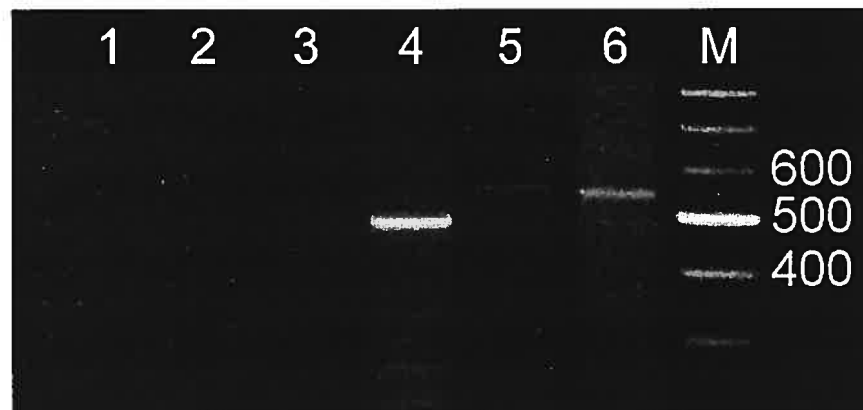


Figure 6 : GNPDA/oscillin mRNA expression in unfertilized mouse oocytes. PCR products obtained from two successive amplifications using unfertilized oocyte cDNA with primers specific for GNPDA/oscillin (1st run, lane 3, 2nd run, lane 4) or primers specific for β -actin (1st run, lane 5, 2nd run, lane 6). Lanes 1 and 2 were loaded with PCR products from an amplification using specific primers for GNPDA/oscillin without any cDNA (1st and 2nd run respectively). Lane M was loaded with a 100 bp DNA ladder.

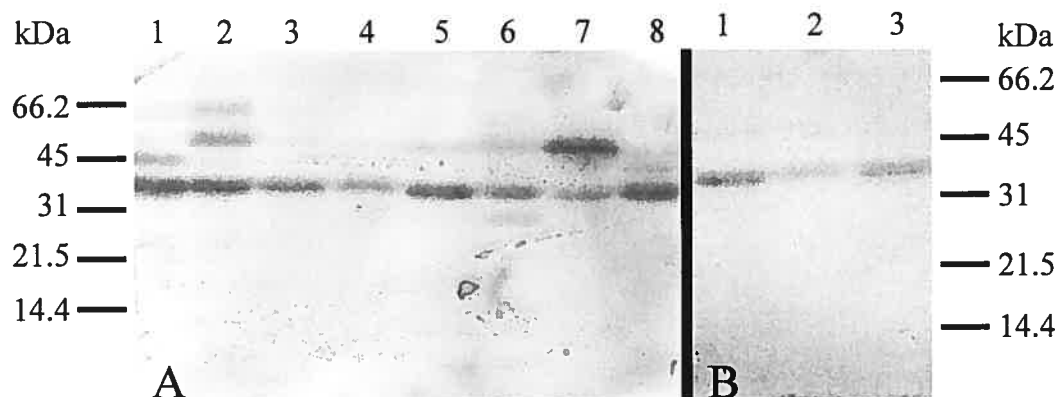


Figure 7 : Western blot analysis of mouse GNPDA/oscillin. A) GNPDA/oscillin expression in different mouse tissues. Each lane was loaded with 50 μ g of protein from testis, kidney, spleen, lung, ovary, liver, heart and brain (1-8). B) GNPDA/oscillin expression in mammalian spermatozoa. Each lane was loaded with 50 μ g of protein from mouse, hamster or human spermatozoa (1-3). M_r of used markers are indicated on each sides of the panel.

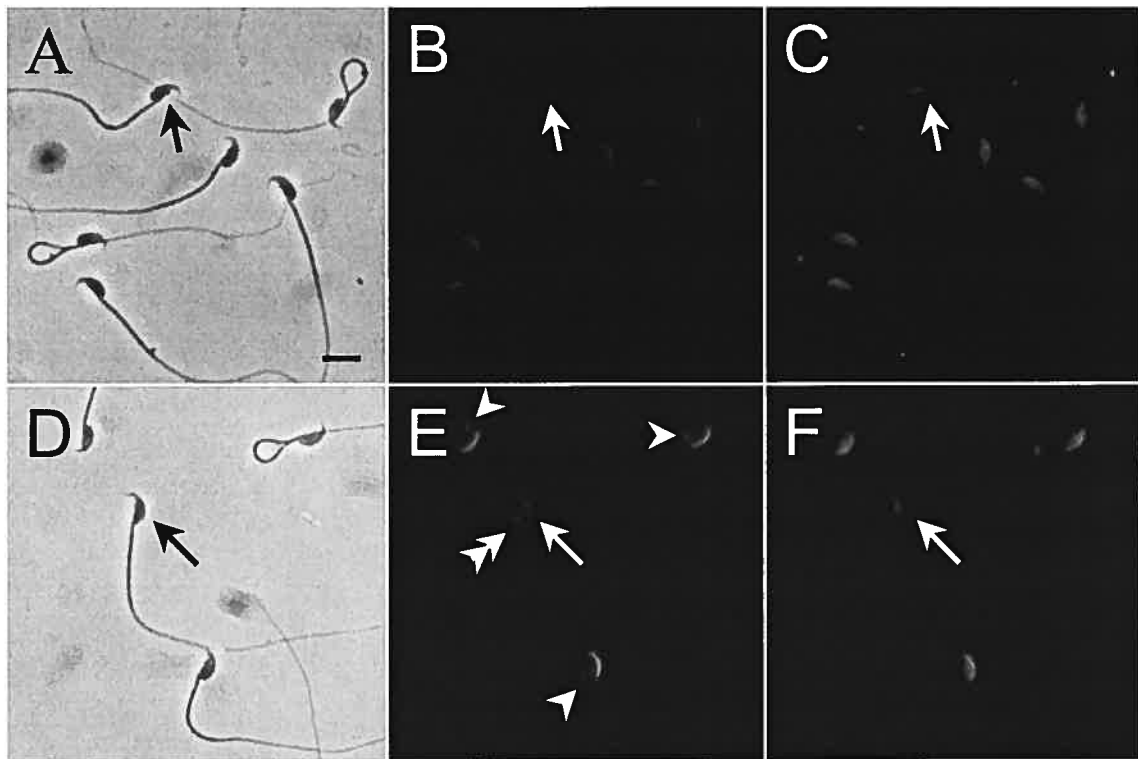


Figure 8 : Immunolocalization of GNPDA/oscillin and tr-kit proteins in mouse spermatozoa. (A-C) GNPDA/oscillin was localized in mouse spermatozoa using a polyclonal antibody and the staining was observed exclusively in the acrosomal region (B). A staining using the lectin *Pisum sativum* (C) shows that a sperm without an intact acrosome, e.g. scored negative with the lectin (arrow), also lacks staining by the GNPDA/oscillin antibody (arrow, B). The corresponding phase-contrast image is shown, with a 10 μ m scale bar in (A). (D-F) Tr-kit was localized in sperm with an affinity-purified polyclonal antibody. Tr-kit is found in the acrosome and connecting piece region (arrowheads) of the sperm (E). A sperm without an intact acrosome (arrow, F) no longer shows acrosome staining (arrow, E) while the staining in the connecting piece region is maintained (double arrowhead, E). The corresponding phase-contrast image is shown in (D).

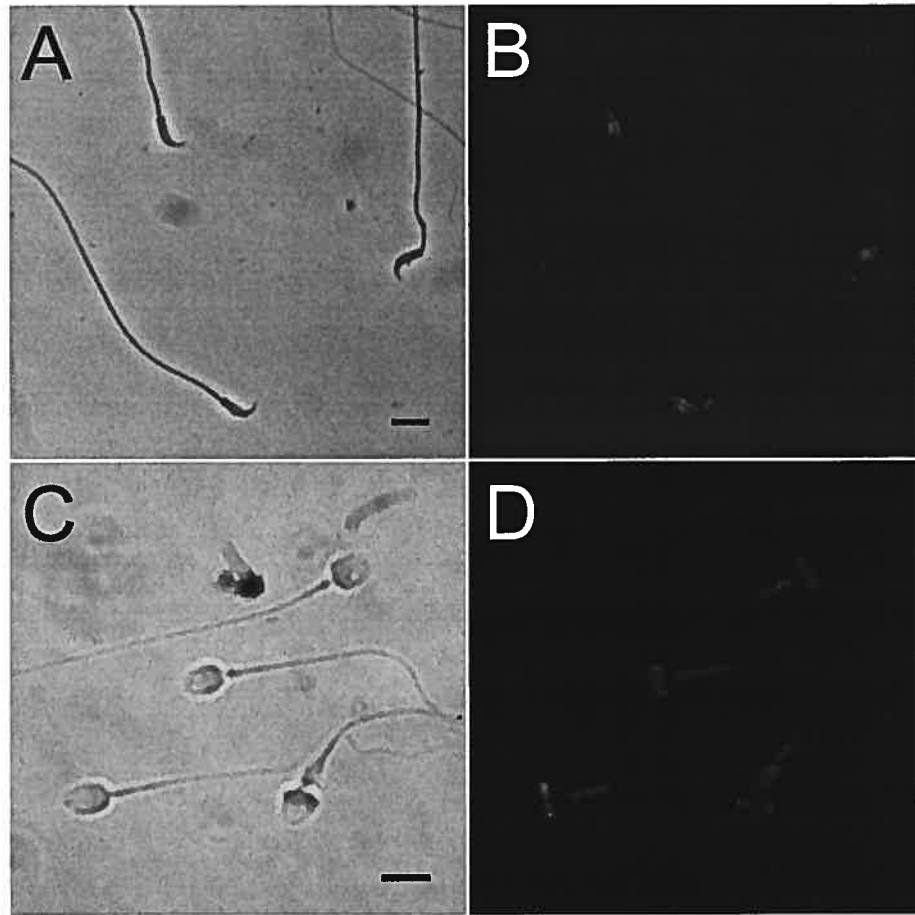


Figure 9: Immunolocalization of GNPDA/oscillin in hamster and human spermatozoa. GNPDA/oscillin is found in the equatorial region and at the tip of the acrosome of hamster sperm (A-B). The staining was performed using a polyclonal antibody and the corresponding phase contrast image is shown (A, scale bar, 10 μm). GNPDA/oscillin was localized in the equatorial and neck regions of human sperm (D). The corresponding phase-contrast image is also shown (C, scale bar, 5 μm).

4.2 Signalisation via l'AMPC et le calcium intracellulaire induite par la sérotonine dans les complexes ovocyte-cumulus de souris

Manuscrit soumis à la revue Molecular Pharmacology

**Intracellular cAMP and calcium signaling
by serotonin in mouse cumulus-oocyte complexes**

Pascal Amireault and François Dubé

Département d'obstétrique-gynécologie, Université de Montréal and Centre de
recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôpital Saint-Luc,
264 boul. René-Lévesque est, Montréal, Québec, Canada H2X 1P1

Running title: cAMP and calcium signaling by serotonin in mouse COCs

Corresponding author: François Dubé, phone number: (514) 890-8310, ext. 35819

Fax number: (514) 412-7314, [REDACTED] [REDACTED]

Manuscript length : 37 pages

Tables : 1

Figures : 9

References : 46

Abstract : 253 words

Introduction : 769 words

Discussion : 1693 words

List of abbreviations : 5-HT: serotonin, RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction, BAPTA-AM: Glycine, N,N'-[1,2-ethanediylbis(oxy-2,1-phenylene)]bis[N-[2-[(acetyloxy) methoxy]-2-oxoethyl]]-, bis[(acetyloxy)methyl] ester, GVBD : germinal vesicle breakdown, GPCR : G-protein-coupled receptors, SAGE : serial analysis of gene expression, IBMX : 3-isobutyl-1-methylxanthine, hCG : human chorionic gonadotropin, COC : cumulus-oocyte complex, 5-CT : 5-carboxamidotryptamine maleate, 8-OH DPAT : 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin, PPB : 2-[1-(4-piperonyl) piperazinyl] benzothiazole, DMSO : dimethyl sulfoxide, kDa : kilo Dalton

Abstract

Cyclic AMP (cAMP) and intracellular Ca^{2+} are important second messengers involved in mammalian follicular growth and oocyte meiotic maturation. We investigated the capacity of the neurohormone serotonin (or 5-hydroxytryptamine, 5-HT) to regulate intracellular cAMP and Ca^{2+} in mouse oocytes and surrounding cumulus cells. Based on a RT-PCR study, 5-HT₇ receptor mRNA is expressed in cumulus cells, oocytes and embryos up to the 4-cell stage and 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptor mRNAs in cumulus cells only, while 5-HT_{2C}, 5-HT₄ and 5-HT₆ receptors are expressed neither in oocytes nor cumulus cells. The addition of 5-HT (10 nM-10 μM) to isolated metaphase II oocytes had no effect on their internal cAMP or Ca^{2+} levels whereas it caused dose-dependent cAMP and Ca^{2+} increases in cumulus cells. This cAMP increase in cumulus cells could be mimicked by 5-HT agonists with the following order of potency: 5-HT > 8-OH DPAT = α -methyl-5-HT = 5-CT, thereby supporting a preferential involvement of 5-HT₇ receptors. As measured with cumulus cells pre-loaded with fura-2-AM, the addition of 5-HT also caused dose-dependent Ca^{2+} rises, likely linked to detected 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors. Adding the Ca^{2+} ionophore ionomycin to cumulus cells resulted in both Ca^{2+} and cAMP elevations whereas preincubation of cells with the Ca^{2+} chelator BAPTA-AM abolished the 5-HT-induced Ca^{2+} increase and reduced the cAMP rise, indicating cross-talk between the 5-HT-sensitive Ca^{2+} and cAMP pathways. Our results show that 5-HT may be a local regulator in mouse cumulus-oocyte complexes through its actions on cAMP and Ca^{2+} signaling, as mediated by 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT₇ receptors.

Introduction

Cyclic AMP (cAMP) and intracellular Ca^{2+} are involved in several important reproductive functions in mammals. One role of cAMP, in the mammalian ovary, is the maintenance of the oocytes arrested in prophase I until ovulation. The high internal cAMP required for the maintenance of oocyte meiotic arrest appears to be provided, in part, by granulosa cells tightly connected to oocytes through gap junctions, allowing free transfer of both cAMP and Ca^{2+} ions (Conti *et al.*, 2002; Webb *et al.*, 2002a,b). In the whole follicle, cAMP, along with intracellular Ca^{2+} , is also involved in FSH-induced expressions of P450scc, aromatase, and LH receptor in granulosa cells (Gore-Langton and Armstrong, 1988; Leung and Steele, 1992). LH also promotes cAMP and Ca^{2+} increases in theca cells, leading to CYP11A and CYP17 gene expressions (Gore-Langton and Armstrong, 1988; Leung and Steele, 1992). At fertilization, the oocyte undergoes an initial Ca^{2+} increase, followed by periodic oscillations that are essential for meiosis reinitiation, cortical granule exocytosis and proper embryo development (Kline and Kline, 1992; Lawrence *et al.*, 1998). Thus, cAMP and Ca^{2+} signaling is required not only for various functions within both oocytes and their surrounding granulosa cells, but also for their intimate coordination one with the other. Despite this central role of Ca^{2+} and cAMP, little is known about their upstream regulation by potential ligands and receptors, to be identified, that might influence their cellular levels.

One such potential ligand is serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT), whose action is well-known as a regulator of spawning and oocyte maturation in several invertebrates (Colas and Dubé, 1998; Stricker and Smythe, 2000) and also of follicular growth in fishes (Cerdeira *et al.*, 1998), but whose potential functions in mammalian reproductive tissues, through Ca^{2+} and cAMP signaling, are poorly documented. Among the indications that 5-HT might be such a local regulator is its detection in female rodent genital tracts (Amenta *et al.*, 1992) and in human follicular fluid (Bodis *et al.*, 1993). Moreover, 5-HT has also been recently reported in isolated mouse oocytes and embryos (Il'kova *et al.*, 2004; Amireault and Dubé, 2005) as well as in surrounding cumulus cells that also possess the rate-limiting enzyme tryptophan hydroxylase (TPH1) for 5-HT production, thus making these cells a potential immediate direct source of 5-HT

(Amireault and Dubé, 2005). Also, *in vitro*, 5-HT promotes estradiol secretion by rat (Tanaka *et al.*, 1993) and hamster (Terranova *et al.*, 1990) pre-ovulatory follicles, and progesterone secretion by cultured bovine luteal cells (Battista *et al.*, 1987). Finally, it was also shown that an antidepressant-sensitive specific 5-HT transporter was active in mouse oocytes and embryos to accumulate external 5-HT (Amireault and Dubé, 2005). All these observations suggest the existence of a local and functional serotonergic network in reproductive tissues in general, and in mouse cumulus-oocyte complexes, in particular. A proper identification of the specific 5-HT receptors involved in the regulation of this serotonergic network remains however to be established.

Mammalian 5-HT receptors are divided into seven subfamilies (5-HT₁₋₇) sharing common sequences, pharmacological properties and signaling pathways, and most of them are G-protein-coupled receptors (GPCR) regulating cAMP or intracellular Ca²⁺. For example, 5-HT₁ receptors are coupled preferentially to G_{i/o} to inhibit cAMP formation (Barnes and Sharp, 1999) while 5-HT₄, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors are coupled to G_s and, hence, positively regulate adenylate cyclase, causing cAMP increases when activated (Hamblin *et al.*, 1998). 5-HT₂ receptors are coupled to G_q and linked to phospholipase C, thus mobilizing intracellular Ca²⁺ (Roth *et al.*, 1998). Only a few of these 5-HT receptor subtypes have been reported in mammalian reproductive tissues and cells. First, the 5-HT₇ receptor was detected in cultured human granulosa-lutein cells (Graveleau *et al.*, 2000) in which 5-HT promotes the expected cAMP elevation. Also, in isolated metaphase II hamster oocytes, 5-HT induces intracellular Ca²⁺ oscillations sensitive to 5-HT₂ antagonists (Miyazaki *et al.*, 1990), suggesting the presence of this receptor type in oocytes. Moreover, a polymerase chain reaction-serial analysis of gene expression (PCR-SAGE) study reported the expression of 5-HT_{2A} receptor mRNA in human oocytes (Neilson *et al.*, 2000) and an RT-PCR analysis suggested the expression of 5-HT_{1D} receptor mRNA in mouse oocytes and embryos (Vesela *et al.*, 2003).

All these findings support an involvement of 5-HT and some of its receptors in various key processes in oocytes and surrounding cells, likely to involve cAMP and/or Ca²⁺ signaling. We, therefore, decided to clarify the effects of 5-HT on cAMP and Ca²⁺ levels in mouse oocytes and cumulus cells, as well as to identify the 5-HT receptors

regulating these effects, with special attention given to those two G_q and G_s subtypes, 5-HT₂ and 5-HT₇, previously detected in other mammalian reproductive tissues or cells.

Material and methods

Oocyte and embryo collection

Fully-grown germinal vesicle stage oocytes, ovulated metaphase II oocytes and pre-implantation embryos at various stages were obtained from 3-4-week-old female B6C3F1 mice (Charles River) after standard gonadotropin injection. For germinal vesicle stage oocytes, the mice were primed with 5 IU of pregnant mare's serum (Sigma), and cumulus-enclosed, fully-grown oocytes were collected 46-48 h later, by puncturing of the antral follicles with a 30-gauge needle under a dissecting microscope, in M2 medium containing 100 μ M 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX). When needed, the cumulus cells were removed by repeated pipetting with a small bore pipette. For metaphase II arrested eggs, the mice were primed with 5 IU of pregnant mare's serum, followed (44-48 h later) by a 5 IU human chorionic gonadotropin (pregnyl-hCG, Organon Canada) injection, and cumulus-enclosed eggs (COC-metaphase II) were collected from the oviduct 18-20 h later in M2 medium. When needed, the cumulus cells were dispersed in M2 medium containing 10 mg/ml bovine testis hyaluronidase (Sigma), and the eggs were washed and collected in M2 medium. For embryos, female mice were submitted to the gonadotropin protocol and were allowed to mate with a male the night after the second injection. Embryos were collected by flushing, with M2 medium, the oviducts or uteri with a 30-gauge needle mounted on a syringe. The timing of embryo collection was as follows: 1-cell, 19 h post-hCG; 2-cell, 43 h; 4-cell, 50 h; 8-cell, 67 h; morula, 74 h; early blastocysts, 91 h.

mRNA isolation and reverse transcription (RT)-PCR

Collected cells were incubated in acidic Tyrode's solution (Sigma) to remove the zona pellucida of germinal vesicle oocytes, metaphase II eggs, and 1-cell embryos. The cells were kept in a minimum of M2 medium at -80°C until mRNA isolation. mRNAs of 10 oocytes, 10 embryos or cumulus cells from 30-50 COC-metaphase II were isolated according to the micro-scale protocol with the Dynabeads mRNA Direct kit (Dyna). The mRNAs were reverse transcribed using Superscript II enzyme (Gibco BRL) in a 20 μ L reaction at 42°C, for 45 min, to construct a cDNA library immobilized on beads,

following the manufacturer's specifications. The first PCR run (50 μ L) was performed on cDNA beads in suspension. The PCR program, of 26 cycles with a hot start, consisted of denaturation of 90 sec at 95°C, primer annealing of 90 sec at 65°C (5-HT₇ and 5-HT_{2A}) or 60°C (5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₄ and 5-HT₆), and primer extension of 90 sec at 72°C (last primer extension of 15 min). The second PCR run was performed with 1/10 of a μ L of products from the first amplification and the same PCR program (28 cycles). For 5-HT₇, 2 pairs of primers in a nested PCR strategy produced final amplicons of 174 bp (5-HT_{7a}), 179 bp (5-HT_{7b}) or 272 bp (5-HT_{7c}). The primers were: 1st forward 5'-cagccaaacacaagttctcag-3', 1st reverse 5'-cccctgttctgcattacttctt-3', 2nd forward 5'-tccagtgccagtaccggaatatcaac-3' and 2nd reverse 5'-tacttcttctccagggttccgctct-3'. For 5-HT_{2A}, 2 pairs of primers were used in a nested PCR strategy to produce amplicons of 627 bp (forward 5'-tcttctccacggcatccatcatgcac-3' and reverse 5'-caaacacattgagcaggggtccaatgac-3') and 419 bp (forward 5'-accatagccgcttcaactccagaacc-3' and reverse 5'-tgcttttctgctcattgctgatggactgc-3'). For 5-HT_{2B}, 2 pairs of primers were used in a nested PCR strategy to produce amplicons of 678 bp (forward 5'-tgtctgaacaaagcacaacttctgagc-3' and reverse 5'-ccatgatggtgagaggtacgaagaaag-3') and 451 bp (forward 5'-actcagtagcagaggaaatgaagcaga-3' and reverse 5'-gcgatgcctattgaaattaaccatacc-3'). For 5-HT_{2C}, 2 pairs of primers were used in a nested PCR strategy to produce amplicons of 658 bp (forward 5'-gcagtacgtaatcctattgagcatagcc-3' and reverse 5'-ttttgtgaagagagtgtacaccagagg-3') and 411 bp (forward 5'-ttctcatcccggtgacaattatgg-3' and reverse 5'-cacatagccaatccaacaaacaca-3'). For 5-HT₄, 2 pairs of primers were used in a nested PCR strategy to produce amplicons of 649 bp (forward 5'-ctaattgtgagttccaacgagggttc-3' and reverse 5'-tgctccttagcagtgacatagattcg-3') and 512 bp (forward 5'-gttccttgagtggttatcctgatg-3' and reverse 5'-tgatagcatagggtgtgtgacct-3'). For 5-HT₆, 2 pairs of primers were used in a nested PCR strategy to produce amplicons of 790 bp (forward 5'-caacacgtctaacttcttctggtgt-3' and reverse 5'-gatgatagggttcagtggtctattacag-3') and 454 bp (forward 5'-ctaacttcttctggtgtcgtcttc-3' and reverse 5'-aagatcctgcagtaggtgaagcagat-3'). Primers for β -actin as positive controls yielded 540-bp (forward 5'-gtgggccgctctaggcaccaa-3' and reverse 5'-ctctttgatgtcacgcacgatttc-3') and 277-bp (forward 5'-tgtgatggtgggaatgggtcagaaggac-3' and reverse 5'-tacgtacatggctggggtgtgaagg-3').

amplicons. 25 μ L of each reaction was loaded on agarose gel stained with ethidium bromide. Each amplification was executed at least 3 times, yielding similar results. All PCR products obtained were cloned in pCRII (Invitrogen) and sequenced on both strands, using the Université Laval sequencing service to confirm the sequence.

Indirect immunofluorescence confocal microscopy for 5-HT₇ and 5-HT_{2A} detection

Oocytes and embryos were collected and treated as described above, then fixed in fresh paraformaldehyde 4% for 30 min at room temperature. They were washed 3 times for 5 min in Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS), before a 1-h blocking step in D-PBS/milk 5%/Triton 0.5%/normal goat serum (NGS) 5%. They were next incubated overnight at 4°C with a primary antibody in D-PBS/milk 1%/Triton 0.1%/NGS 1%. After 3 washes in D-PBS, they were incubated for 1 h at room temperature in a Cy-3-conjugated goat anti-rabbit antibody (1/2,000, Jackson Immunoresearch), and washed 3 times in D-PBS. Finally, metaphase II arrested eggs, COC-metaphase II, cumulus cells and 4-cell embryos were mounted with Fluoromount (Electron Microscopy System), and blastocysts were mounted with 50% glycerol in D-PBS. Images were collected with a 63X/1.4 oil DIC plan-apochromat objective and a Zeiss Axiovert 100M microscope coupled with the LSM510 system.

For 5-HT₇, a rabbit anti-rat antibody directed against amino acids 8-23 (Oncogene) and diluted 1/200 served as primary antibody. For 5-HT_{2A}, a rabbit anti-rat antibody directed against amino acids 22-41 (Oncogene) was diluted 1/150. Controls without the first antibody were also included for each cell type tested.

Western blotting

For each detection of 5-HT_{2A} and 5-HT₇, approximately 300 and 500 oocytes, respectively, and corresponding surrounding cumulus cells were lysed in 30 μ L of 0.5% sodium dodecyl sulphate (SDS) and kept at -80°C until electrophoresis. The frozen samples were diluted in 4X sample buffer, loaded on 7.5% SDS-polyacrylamide gel, run at 200 V for 45 min and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. The membrane was blocked with 5% milk and 0.1% Tween 20 in D-PBS for 1 h at room temperature before overnight incubation at 4°C, in fresh blocking solution containing the

appropriate diluted first antibody. The membrane was then washed 3 times in 0.1% Tween 20 in D-PBS and incubated in fresh blocking solution containing the appropriate diluted second antibody. Finally, the membrane was washed several times in 0.1% Tween 20 in D-PBS before the detection protocol, using the enhanced chemiluminescence plus assay kit (Amersham). The same 5-HT₇ (1/500) and 5-HT_{2A} (1/500) antibodies as for indirect immunofluorescence detection were deployed for Western blotting with a goat anti-rabbit-horse radish peroxidase secondary antibody (1/20,000, Bio-Rad).

cAMP extraction and measurement after cell treatments

Groups of 10 COC-metaphase II or 50 metaphase II oocytes were collected, as described above, and treated for 5 min in small Petri dishes containing a drop of M16 medium supplemented with 200 μ M IBMX, under paraffin oil, in a humidified chamber at 37°C and 5% CO₂. Stock solutions of 10 mM 5-carboxamidotryptamine maleate (5-CT, Tocris), 5-hydroxytryptamine creatinine sulfate complex (5-HT, Sigma), 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH DPAT, Tocris) or α -methyl 5-HT maleate (α -methyl-5-HT, Tocris) were prepared at 10 mM in H₂O and kept in aliquots at -20°C. Stock solutions of 2-[1-(4-piperonyl) piperazinyl] benzothiazole (PPB, Tocris) at 10 mM in DMSO, forskolin at 10 mM in DMSO, BAPTA AM (Molecular Probes) at 20 mM in DMSO and ionomycin (Sigma) at 1 mM in ethanol were also prepared and kept the same way. One 10 mM aliquot of the appropriate drug was thawed and diluted before each experiment. In the BAPTA-containing conditions, groups of cells were incubated in M16 medium containing 50 μ M BAPTA AM and 0.02% Pluronic F-127 (Molecular Probes) for 30 min, under paraffin oil, in a humidified chamber at 37°C and 5% CO₂ before the 5-min treatment. Treatments were stopped by transfer of the cells, with a minimum of medium, to a new tube and its immersion in liquid nitrogen. The cells were kept at -80°C until cAMP extraction. Frozen cells were thawed and frozen in liquid nitrogen 2 more times to ensure complete lysis of the cells. Then, 100 μ L of cold 95% ethanol 0.1% trichloroacetic acid was added to each tube, and the cells were centrifuged at 3,000 rpm for 10 min at 4°C. The supernatant was evaporated, and the remaining pellet was resuspended in 50 μ L of assay buffer (cAMP Biotrak enzyme immunoassay

system kit, Amersham Biosciences). cAMP was measured according to the acetylation procedure described in the manufacturer's booklet.

Intracellular Ca^{2+} measurement in oocytes and cumulus cells

For cumulus cell Ca^{2+} measurements, COC-metaphase II were collected, as described above, and incubated in M2 medium containing 5 μM fura-2-AM and 0.02% Pluronic F-127 for 25 min at 37°C. After 3 washes in M2 medium, the COCs were transferred into a 100- μl plastic chamber, containing M2 medium supplemented with 10 mg/ml bovine testis hyaluronidase, on a poly-lysine coverslip installed on the stage of an inverted microscope (Diaphot, Nikon). After a few minutes to allow dispersion of the cumulus cells and their adherence to the coverslip, the chamber was perfused (5 ml/ min) with M2 medium until a stable baseline signal was obtained. M2 medium or M2 medium containing 10 nM, 100 nM, 1 μM 5-HT or 200 μM ATP, maintained at 37°C was perfused at a rate of 5ml-min throughout each experiment. For metaphase II oocyte measurements, oocytes without zona pellucida were prepared like cumulus cells but for the hyaluronidase-containing step. Fluorescence signals were obtained from a fluorescence lamp coupled to a high speed filter changer (Lambda DG-4 , Sutter Instrument Company) and a refrigerated CCD Camera (Photometrics Cool SNAP HQ, Roper Scientific). Excitation wavelenghts were 340 and 380 nm, and fluorescence emission was measured at 510 nm. The collected data were then analysed by Metafluor program 6.1 (Universal Imaging Corporation).

Statistical analysis

The results of cAMP measurement are expressed as means \pm SEM. Each experiment was performed at least 3 times in duplicate. Statistically significant differences between group means and the control mean were analysed by unpaired Student's t test.

Results

Expression of 5-HT_{2A} and 5-HT₇ receptor mRNAs in COCs and embryos

Adopting a nested RT-PCR strategy with oligonucleotides flanking intron sequences and specific for mouse 5-HT₇ mRNA, we detected a band of the proper size in preparations from the ovary, cumulus cells, germinal vesicle stage oocytes, metaphase II oocytes, 1-cell embryos, 2-cell embryos and 4-cell embryos, but not in 8-cell embryos, morula and blastocysts (Fig. 1A, upper panel). Taking a similar RT-PCR approach for 5-HT_{2A} mRNA, an amplified band of the expected size (confirmed by sequencing), was detected in mRNA preparations of ovary and cumulus cells, but not in oocytes or pre-implantation embryos of any developmental stage (Fig. 1A, middle panel).

In addition to the known mouse 5-HT₇ sequence, to which our band (called a) was identical (as verified by sequencing), we detected 2 additional isoforms (herein called isoforms b and c, sequences deposited in GenBank #AY450670 and AY450671) that had not been described previously for the mouse, but are homologous to rat isoforms b and c, known to result from alternative splicing (Heidmann *et al.*, 1997). Mouse isoform a mRNA disappears by the 8-cell stage, whereas isoforms b and c disappear sooner, by the 4-cell and 2-cell stages respectively (Fig. 1A, upper panel).

Figure 1B compares the deduced C-terminal amino acid sequence of mouse, rat and human 5-HT₇ receptor isoforms. As already described, mouse and rat isoforms a are identical in their C-terminal region while human isoform a differs for 5 amino acids (Fig. 1B, underlined). The isoform b that we identified in the mouse is identical to rat isoform b and differs only by 1 amino acid from the human sequence. For the last isoform, the C-terminal tail following the alternative splicing site differs between rats (isoform c) and humans (isoform d) and yields 2 different C-terminal sequences with no homology. The sequencing of this last isoform in the mouse showed that the mouse expresses an isoform c which differs only for 6 amino acids compared to the rat. As with rat isoform c, mouse isoform c has no homology with human isoform d (Fig. 1B).

Expression of 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₄ and 5-HT₆ receptor mRNAs in metaphase II oocytes and cumulus cells

A similar nested RT-PCR strategy was also conducted to verify the mRNA expression of the other G_q-coupled receptor subtypes, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C}, and G_s-coupled receptor subtypes 5-HT₄ and 5-HT₆. None of these receptors could be detected in metaphase II oocytes (Fig. 2, lane 1). In cumulus cell preparations, the 5-HT_{2B} receptor mRNA could be detected but not the 5-HT_{2C}, 5-HT₄ or 5-HT₆ receptor mRNAs (Fig. 2, lane 2). Appropriate positive and negative controls were also conducted with, respectively, brain preparations (Fig. 2, lane 3) and preparations without cDNAs for each receptor (Fig. 2, lane 4).

Expression of 5-HT_{2A} and 5-HT₇ receptor proteins in COCs and embryos

In addition to 5-HT₇ and 5-HT_{2A} mRNAs, we verified the presence of corresponding proteins by Western blotting and indirect immunofluorescence microscopy, utilizing specific antibodies for each receptor. Figure 3 depicts the positive detection of both receptors, at expected size ranges, with a common band (53 kDa) for 5-HT₇ in cumulus cells and isolated oocytes (Fig. 3A), and a doublet of bands (51-63 kDa) for 5-HT_{2A} in cumulus cells but not in oocytes (Fig. 3B). With the same antibodies under indirect immunofluorescence microscopy, COCs exhibited strong 5-HT_{2A}-associated peripheral immunoreactivity in cumulus cells (Fig. 4A-A'), but no staining of enclosed or isolated oocytes (Fig. 4A-A' and 4B-B'), 4-cell embryos (Fig. 4C-C') or blastocysts (data not presented). No cell labeling was found when the anti-5-HT_{2A} antibody had been previously depleted by pre-incubation with a 5-HT_{2A} blocking peptide or when only a secondary antibody was used (data not shown). In contrast, 5-HT₇-associated immunoreactivity in COCs revealed strong oocyte labeling compared to weaker labeling at the periphery of cumulus cells (Fig. 5A-A'). Isolated oocytes also showed strong immunoreactive 5-HT₇-labeling (Fig. 5B-B'). In 4-cell embryos, in which 5-HT₇ mRNA was at the limit of detection, we could still identify strong immunoreactivity associated with each blastomere (Fig. 5C-C'), whereas blastocysts, in agreement with our RT-PCR detecting no 5-HT₇ mRNA, did not display any labeling with the anti-5-

HT₇ antibody (data not presented). In controls, no labeling of any cell type was seen when the first antibody was omitted (data not reported).

Serotonin- and agonist-induced cAMP elevation in COCs

Since the 5-HT₇ receptor is known to be coupled to a rise of cAMP through G_s (Shen *et al.*, 1993), we measured cAMP levels of COCs and metaphase II oocytes after 5-HT treatments. COCs were treated for 5 min with different concentrations of 5-HT in M2 medium containing IBMX to inhibit endogenous phosphodiesterases. Treatments of COCs with 10 nM or 100 nM 5-HT produced, respectively, 19% and 29% rises in their cAMP content, but these differences were not statistically significant (Fig. 6A). Higher doses of 1 μ M and 10 μ M 5-HT resulted in significant increases of 67% ($p < 0.01$) and 79% ($p < 0.001$). Incubating isolated oocytes in M2 medium containing 1 μ M or 10 μ M 5-HT did not affect their cAMP content while incubation in 10 μ M forskolin resulted in a robust elevation of nearly 300% (Fig. 6B). Since 5-HT failed to raise the cAMP content of isolated oocytes, the cAMP increase observed in COCs is likely attributable to cumulus cells through activation of one or multiple 5-HT receptors.

We thus decided to test the effect of different agonists on the cAMP content of COCs, targeting G_s-coupled 5-HT₄, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors. We first used 5-CT, which has mixed 5-HT₆ and 5-HT₇ affinities (Kohen *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1993). Exposure to 1 μ M or 10 μ M 5-CT increased the cAMP content of COCs by 12% and 30%, respectively, with only the 10- μ M dose yielding a significant increment ($p < 0.01$, Fig. 7A). With 1 or 10 μ M 8-OH DPAT, a 5-HT_{1A} and 5-HT₇ agonist (Stam *et al.*, 1992), the cAMP content of COCs rose by 18% and 36% ($p < 0.05$), respectively (Fig. 7B). Next, 1 μ M or 10 μ M PPB, a 5-HT₄ agonist (Ramirez *et al.*, 1997), did not significantly elevate the cAMP content of COCs (Fig. 7C). Finally, since cumulus cells also express 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors, the 5-HT₂ agonist α -methyl-5-HT (Baxter *et al.*, 1995) was tested and induced increases in cAMP of 13% (1 μ M) and 34% (10 μ M, $p < 0.01$) (Fig. 7D). The estimated order of potency was thus 5-HT > 8-OH DPAT = α -methyl-5-HT = 5-CT > PPB, which excludes the possibility of a 5-HT₄ receptor and strongly suggests the involvement of the 5-HT₇ receptor, since 8-OH DPAT was able to evoke a

cAMP rise, in agreement with our RT-PCR study in which the only G_s -coupled receptor mRNA detected was the 5-HT₇ receptor (Figs. 1-2).

Serotonin-induced Ca^{2+} rise in COCs

Expression of the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptor in cumulus cells led us to investigate the effect of 5-HT on the Ca^{2+} level of cumulus cells, since these receptors are known to be coupled to an increase in intracellular Ca^{2+} through G_q in other cell types. Dispersed cumulus cells were constantly perfused for the duration of the recording and, when adding 1 μ M 5-HT, an increment of intracellular Ca^{2+} was detected in 56% of the cells (Fig. 8A, Table 1). At the end of each experiment, the cells were perfused with 200 μ M ATP, and a strong Ca^{2+} increase was observed in 92% of them. This provided a positive control, since it is known that cumulus cells express a P2Y₂ receptor whose activation results in Ca^{2+} increases (Webb *et al.*, 2002a). Intracellular Ca^{2+} chelation with 50 μ M BAPTA-AM before the 5-HT perfusion completely blocked the Ca^{2+} rise (Fig. 8D). Table 1 summarizes the characteristics of the 5-HT responses observed including the dose-response effect of 5-HT on the amplitude of the Ca^{2+} elevation (positive correlation: $R^2=0,081$ and $P<0,0001$), the percentage of reacting cells, and the effect of a BAPTA pre-incubation. The time delay of this Ca^{2+} increase was relatively short, occurring always within the first 12 sec of perfusion with the 5-HT-containing solution. When a sharp spike was observed, it lasted for 20-25 sec, and a long recovery time of approximately 60 sec was needed to return to the original Ca^{2+} level. Experiments carried out with 100 nM or 10 nM 5-HT resulted in lower Ca^{2+} rises, but the time delay of the response, the duration of the peak and recovery time were similar to the 1 μ M-dose response (Fig. 8B and 8C respectively). 5-HT at 1 nM was also tested but clear Ca^{2+} rises were not detectable over the background (data not shown) and the 10 nM dose was considered the critical minimum concentration. It has been reported previously that, in hamster oocytes, 5-HT triggers Ca^{2+} increases that are sensitive to 5-HT₂ antagonists (Miyazaki *et al.*, 1990). Even though we did not detect any 5-HT₂ receptor in mouse oocytes, we decided to investigate the effect of 5-HT on the Ca^{2+} level of mouse oocytes. Perfusion with 10 μ M 5-HT failed to elicit any Ca^{2+} upsurge (0/7, Table 1)

even though these oocytes could respond to a 100 μ M carbachol dose as a positive control (7/7).

Cross-talk between Ca^{2+} and cAMP in COCs

Finally, since 5-HT regulates the cAMP and calcium levels of cumulus cells, we decided to investigate possible cross-talk between these 2 signaling pathways. When COCs were exposed to 5 μ M ionomycin for 5 min to raise intracellular Ca^{2+} , a 280% increase in their cAMP content was observed, indicating that solely augmenting intracellular Ca^{2+} somehow activated endogenous adenylate cyclase, resulting in elevated cAMP (Fig. 9A). This cAMP increment could be prevented by pre-incubation in the presence of BAPTA, confirming the Ca^{2+} -specificity of this ionomycin-induced cAMP rise. We further evaluated whether ionomycin could increase the cAMP level of isolated oocytes. Figure 9B shows that the oocyte cAMP level is not affected by ionomycin, suggesting that the cAMP elevation in COCs is, in this condition, again attributable only to cumulus cells. When COCs were incubated in the presence of BAPTA before the 5-HT addition, the cAMP increment was limited to 36% ($p < 0.01$ vs control) rather than 60% ($p < 0.001$ vs control), but the difference between the 2 conditions was not statistically significant (Fig. 9A). Taken altogether, these results suggest that when COCs were incubated in the presence of BAPTA, the cAMP rise induced by 5-HT was somewhat lower but still significant over untreated control cells (Fig. 9A). Part of the cAMP increase induced by 5-HT in cumulus cells could thus be due to an augmentation of intracellular Ca^{2+} . However, intracellular Ca^{2+} chelation does not preclude part of the 5-HT-induced rise in cAMP which, expectedly, is largely Ca^{2+} -independent.

Discussion

The present work extends our previous demonstration of a local serotonergic network in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos, including the presence of 5-HT itself, of the 5-HT synthesizing enzyme TPH1 in cumulus cells, and a 5-HT-specific uptake driven by a classical antidepressant-sensitive transporter within oocytes and embryos (Amireault and Dubé, 2005). We further show here that 5-HT might exert its local effect through 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT₇ receptors in cumulus cells, oocytes and embryos, and that 5-HT affects intracellular Ca²⁺ and cAMP in cumulus cells as expected from the activation of these identified receptors. Our work therefore completes the panel of required components for a local functional serotonergic network and confirms or extends scattered reports involving 5-HT in reproductive tissues or cells.

We have thus shown that 5-HT induces a dose-dependent increase of cAMP in mouse cumulus cells most likely through a 5-HT₇ receptor. This supports the previous demonstration that 5-HT could elevate the cAMP content of human granulosa-lutein cells in culture, and their progesterone secretion, through activation of a 5-HT₇ receptor (Graveleau *et al.*, 2000). The expression of a 5-HT₇ receptor in these closely-related cell types, from two species, suggests that it might be universally expressed in mammalian follicles. Cyclic AMP in granulosa cells is already known to transduce the effects of FSH and LH and, thus, turns on multiple distinct pathways, depending on the maturational stage of the follicle (Conti, 2002). Our present work adds 5-HT as a new potential intermediate in these processes turned on by cAMP. Our pharmacological and molecular studies further confirm this assumption, since 5-CT and 8-OH DPAT, both 5-HT₇ agonists, could increase the cAMP content of cumulus cells while 5-HT₄ and 5-HT₆ receptor mRNAs could not be detected in these cells.

We detected both mRNA and protein of the 5-HT₇ receptor from germinal vesicle stage oocytes to 4-cell embryos. However, after adding 5-HT to isolated metaphase II oocytes, in contrast to cumulus cells, none of the expected cAMP increment was detectable, suggesting little if any activity of the 5-HT₇ receptor at this specific stage which also shows internal rather than peripheral receptor immunostaining, a condition already reported for inactive and internalized 5-HT₇ receptor in rat brain (Muneoka and

Takigawa, 2003). Still, it remains possible that an oocyte 5-HT₇ receptor might be active at earlier maturational stages when a tighter communication network with surrounding cells is most necessary to further oocyte progression. In this respect, recent evidence indicates that active maintenance of oocytes in prophase I, before ovulation, requires high cAMP, a tight communication with somatic cells, and constant G_s protein activity in mouse oocytes (Mehlmann *et al.*, 2002; Kalinowski *et al.*, 2004). This constant G_s protein activity was shown to rely on the orphan GPR3 receptor since most oocytes (~90%) from *Gpr3* knockout mice resume meiosis prematurely within antral follicles (Mehlmann *et al.*, 2004). If an additional oocyte G_s-linked receptor was participating in the maintenance of meiotic arrest, as suggested by these authors (Mehlmann *et al.*, 2004), at similar or more likely earlier follicular stages, then the G_s-linked 5-HT₇ receptor reported here would be a candidate fulfilling some of the expected attributes with its ligand, 5-HT, being produced by neighbouring somatic cells (Amireault and Dubé, 2005). Alternatively, whether the 5-HT₇ receptor becomes functional at later stages, e.g. in cleavage-stage embryos, remains to be established. In this respect, it is noteworthy that 5-HT antagonists were reported to block or inhibit the progression of early cleavage divisions while 5-HT prevents this effect (Buznikov *et al.*, 1996) whereas other studies reported a negative effect on later blastocyst formation following exposure to 5-HT (Ill'kova *et al.*, 2004) or to the agonist sumatriptan (Vesela *et al.*, 2003). Along this line, interestingly, we detected three distinct 5-HT₇ receptor isoforms in mouse oocytes and embryos that appear to be homologous to known rat (a,b,c) or human (a,b) isoforms (Heidmann *et al.*, 1997). While these three isoforms were not found to differ significantly one with another in their pharmacological properties or functions (Heidmann *et al.*, 1998), their respective abundance observed in various tissues in the rat (most abundant a, then b, then c isoform) seems conserved for mouse oocytes and embryos, with the sequential disappearance of the isoforms (c, b, then a), in our RT-PCR study, possibly reflecting an earlier decline, below a detectable threshold level, of the least expressed isoforms in 2-cell and 4-cell embryos. Therefore, the reported serotonergic effects at the blastocyst stage are unlikely to be linked to the 5-HT₇ receptor whose mRNA has long disappeared by that time but could be due, as

suggested, to a 5-HT_{1D} receptor whose effective expression would however require additional confirmation (Vesela *et al.*, 2003).

One surprising finding in cumulus cells was that the 5-HT₂ agonist α -methyl-5-HT could also increase their cAMP content. However, this α -methyl-5-HT-induced cAMP rise might involve the observed cross-talk between Ca²⁺ and cAMP signaling in these cells. Indeed, the large increment of cAMP seen after ionomycin treatment of cumulus cells in COCs, and blocked by BAPTA, reveals a Ca²⁺-sensitive effect on cAMP levels. An elevation of intracellular Ca²⁺ could lead to such a cAMP increase through activation of calmodulin-sensitive adenylate cyclase isoforms I and VIII (Taussig and Zimmermann, 1998). These adenylate cyclases have never been reported in mouse cumulus cells, but they are expressed in human granulosa cells (Asboth *et al.*, 2001), and could link an α -methyl-5-HT-induced Ca²⁺ rise, through a 5-HT₂ receptor, to increased cAMP. Also, part of the 5-HT-evoked cAMP elevation in cumulus cells could be mediated by this Ca²⁺ increment since BAPTA-pretreated cells showed a smaller rise in cAMP after 5-HT addition.

We investigated the presence of 5-HT_{2A-B-C} receptors in oocytes, embryos and cumulus cells because of the known capacity of 5-HT to cause Ca²⁺ increases in hamster oocytes (Miyazaki *et al.*, 1990; Fujiwara *et al.*, 1993). Our various data clearly establish that none of the 5-HT₂ receptors is expressed in oocytes in agreement with the fact that their Ca²⁺ level is 5-HT-insensitive in the mouse, in contrast to the hamster (our data not shown, and S. Miyazaki, personal communication). Therefore, a species difference exists between the mouse and hamster that presumably reflects a differential expression of the 5-HT₂ and/or 5-HT₇ receptors in mammalian oocytes. Indeed, we have detected, by RT-PCR, 5-HT_{2A} mRNA, but not 5-HT₇ mRNA, in hamster metaphase II oocytes whereas hamster cumulus cells express both subtypes as in the mouse (golden hamster 5-HT_{2A} and 5-HT₇ receptor cDNAs were cloned and sequenced, see GenBank, accession numbers DQ015678 and DQ015679, Amireault and Dubé, unpublished results). This explains the observed Ca²⁺-mobilizing effect of 5-HT in hamster but not mouse oocytes and, additionally, underscores the possibility of species differences in the type(s) of 5-HT receptors expressed in oocytes from diverse mammalian species. This also lends support to the possibility that human oocytes might indeed express a 5-HT_{2A} receptor as

suggested by the detection of a 5-HT_{2A}-specific expressed sequence tag (EST, Neilson *et al.*, 2000).

On the other hand, the expression of the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptor in cumulus cells reveals that these receptors could be involved in follicle growth and steroidogenesis. Indeed, 5-HT has been demonstrated to stimulate estradiol secretion in rat pre-ovulatory follicles, and this could be inhibited by ketanserin, a preferential 5-HT_{2A} antagonist (Tanaka *et al.*, 1993). Also, 5-HT_{2A} receptor densities increase in the rat forebrain at the time of the spontaneous estrogen-induced LH surge, compared to diestrous females (Sumner and Fink, 1997), while ovariectomy reduces 5-HT_{2A} receptor mRNA and protein in the rat frontal cortex (Bethea *et al.*, 1998). Thus, 5-HT_{2A} receptors expressed in cumulus cells could promote steroidogenesis and could be regulated by steroids in a feedback loop, leading to coordinated follicle maturation. It seems likely that the Ca²⁺ responses of cumulus cells to 5-HT are largely mediated by a 5-HT₂ receptor. Preliminary experiments showing that α -methyl-5-HT, an agonist for 5-HT_{2A-B-C} receptors (Baxter *et al.*, 1995) can induce calcium responses in cumulus cells further confirm this assumption (data not shown). Our RT-PCR analysis, showing the expression of both 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptor, but not of the 5-HT_{2C} receptor, makes these two receptors likely candidates to generate the observed Ca²⁺ responses in cumulus cells. However, 5-HT can also evoke Ca²⁺ rises in HEK 293 cells transfected with the 5-HT₇ receptor (Baker *et al.*, 1998). Hence, the activation of all three 5-HT receptors expressed by cumulus cells could generate, at least in part, the observed Ca²⁺ responses after 5-HT addition, even though this is not supported by the lack of effect of 8-OH DPAT on their Ca²⁺ levels (data not shown). The expression of 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT₇ receptors that we report here does not exclude the potential expression of other 5-HT receptor subtypes in both oocytes and cumulus cells, other than the 5-HT_{2C}, 5-HT₄ and 5-HT₆ receptors not detected here, with possible species differences, as mentioned earlier. Further investigations on this local ovarian serotonergic network should therefore include a more thorough survey of other potential 5-HT receptors that might be expressed, along with pharmacological analyses that are however hindered by the heterogeneity of cell populations expressing multiple 5-HT receptors and exhibiting interconnected signaling pathways such as that linking cAMP and Ca²⁺ increases.

In the *in vivo* context, the serotonergic network displayed in mouse COCs, could be implicated in the autocrine and paracrine regulation of coordinated follicular growth, known to involve bidirectional communication between the oocyte and the somatic compartment, but through communicating channels still largely unresolved (Picton *et al.*, 1998; Eppig, 2001). This local ovarian serotonergic network might regulate the cAMP and Ca^{2+} levels not only of cumulus cells, but also of the oocytes themselves, either directly through their expressed 5-HT₇ receptor, or indirectly through the physical bridging with cumulus cells by gap junctions.

In conclusion, our work demonstrates that 5-HT can regulate the Ca^{2+} and cAMP levels of mouse cumulus cells most likely through expressed 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT₇ receptors. Also, oocytes and embryos up to the 4-cell stage express the 5-HT₇ receptor, but further work is needed to determine at which stage(s) this receptor is functional. Such uncovering of an ovarian local serotonergic network opens new avenues for understanding the intricate processes underlying follicle maturation, meiotic maturation and, eventually, early embryonic development.

Acknowledgments

We thank B.G. Allen and the Institut de cardiologie de Montréal for providing access to their confocal microscope, and L.R. Villeneuve for technical assistance with it. M. Sainte-Marie is acknowledged for help with collecting oocytes and embryos. Thanks are also due to Ovid Da Silva, Editor, Research Office, Research Centre, CHUM, for editing this text.

References

- Amenta F, Vega JA, Ricci A and Collier WL (1992) Localization of 5-hydroxytryptamine-like immunoreactive cells and nerve fibers in the rat female reproductive system. *Anat Rec* 233:478-484
- Amireault P and Dubé F (2005) Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus oocyte complexes and early embryos. *Biol Reprod* 73:358-365.
- Asboth G, Price SA, Bellinger J, Ledger W, Barlow DH and Bernal AL (2001) Characterization of adenylyl cyclases in cultured human granulosa cells. *Reproduction* 121:217-228.
- Baker LP, Nielsen MD, Impey S, Metcalf MA, Poser SW, Chan G, Obrietan K, Hamblin MW and Storm DR (1998) Stimulation of type 1 and type 8 Ca^{2+} /calmodulin-sensitive adenylyl cyclases by the Gs-coupled 5-hydroxytryptamine subtype 5-HT_{7A} receptor. *J Biol Chem* 273:17469-17476.
- Barnes NM and Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083-1152.
- Battista PJ, Rexroad CE, Jr. and Condon WA (1987) Mechanisms involved in the action of serotonin-induced stimulation of progesterone production by bovine luteal cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 51:145-151.
- Baxter G, Kennett G, Blaney F and Blackburn T (1995) 5-HT₂ receptor subtypes: a family re-united? *Trends Pharmacol Sci* 16:105-110.
- Bethea CL, Pecins-Thompson M, Schutzer WE, Gundlah C and Lu ZN (1998) Ovarian steroids and serotonin neural function. *Mol Neurobiol* 18:87-123.

Bodis J, Hartmann G, Torok A, Bogнар Z, Tinneberg HR, Cledon P and Hanf V (1993) Relationship between the monoamine and gonadotropin content in follicular fluid of preovulatory graafian follicles after superovulation treatment. *Exp Clin Endocrinol* 101:178-182.

Buznikov GA, Shmukler YB and Lauder JM (1996) From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development. *Cell Mol Neurobiol* 16:533-559.

Cerda J, Subhedar N, Reich G, Wallace RA and Selman K (1998) Oocyte sensitivity to serotonergic regulation during the follicular cycle of the teleost *Fundulus heteroclitus*. *Biol Reprod* 59:53-61.

Colas P and Dubé F (1998) Meiotic maturation in mollusc oocytes. *Sem Cell Dev Biol* 9:539-548.

Conti M (2002) Specificity of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signal in granulosa cell function. *Biol Reprod* 67:1653-1661.

Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, Jin C and Tsafiriri A (2002) Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol* 187:153-159.

Eppig JJ (2001) Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122:829-838.

Fujiwara T, Nakada K, Shirakawa H and Miyazaki S (1993) Development of inositol trisphosphate-induced calcium release mechanism during maturation of hamster oocytes. *Dev Biol* 156:69-79.

Gore-Langton RE and Armstrong DT (1988) Follicular steroidogenesis and its control, in *Physiology of reproduction* (Knobil E and Neill J eds) pp 331-385, Raven Press, New York.

Graveleau C, Paust HJ, Schmidt-Grimminger D and Mukhopadhyay AK (2000) Presence of a 5-HT₇ receptor positively coupled to adenylate cyclase activation in human granulosa-lutein cells. *J Clin Endocr Metab* 85:1277-1286.

Hamblin MW, Guthrie CR, Kohen R and Heidmann DE (1998) Gs protein-coupled serotonin receptors: receptor isoforms and functional differences. *Ann NY Acad Sci* 861:31-37.

Heidmann DE, Metcalf MA, Kohen R and Hamblin MW (1997) Four 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization. *J Neurochem* 68:1372-1381.

Heidmann DE, Szot P, Kohen R and Hamblin MW (1998) Function and distribution of three rat 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms produced by alternative splicing. *Neuropharmacology* 37:1621-1632.

Il'kova G, Rehak P, Vesela J, Cikos S, Fabian D, Czikkova S and Koppel J (2004) Serotonin localization and its functional significance during mouse preimplantation embryo development. *Zygote* 12:205-213.

Kalinowski RR, Berlot CH, Jones TL, Ross LF, Jaffe LA and Mehlmann LM (2004) Maintenance of meiotic prophase arrest in vertebrate oocytes by a Gs protein-mediated pathway. *Dev Biol* 267:1-13.

Kline D and Kline JT (1992) Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 149:80-89.

Kohen R, Metcalf MA, Khan N, Druck T, Huebner K, Lachowicz JE, Meltzer HY, Sibley DR, Roth BL and Hamblin MW (1996) Cloning, characterization, and chromosomal localization of a human 5-HT₆ serotonin receptor. *J Neurochem* 66:47-56.

Lawrence Y, Ozil JP and Swann K (1998) The effects of a Ca²⁺ chelator and heavy-metal-ion chelators upon Ca²⁺ oscillations and activation at fertilization in mouse eggs suggest a role for repetitive Ca²⁺ increases. *Biochem J* 123:335-422.

Leung PC and Steele GL (1992) Intracellular signaling in the gonads. *Endocr Rev* 13 :476-498.

Mehlmann LM, Jones TL and Jaffe LA (2002) Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science* 297:1343-1345.

Miyazaki S, Katayama Y and Swann K (1990) Synergistic activation by serotonin and GTP analogue and inhibition by phorbol ester of cyclic Ca²⁺ rises in hamster eggs. *J Physiol London* 426:209-227.

Muneoka KT and Takigawa M (2003) 5-Hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor immunoreactivity-positive 'stigmoid body'-like structure in developing rat brains. *Int J Dev Neurosci* 21:133-143.

Neilson L, Andalibi A, Kang D, Coutifaris C, Strauss JF, Stanton JL and Green DL (2000) Molecular phenotype of the human oocyte by PCR-SAGE. *Genomics* 63:13-24.

Picton H, Briggs D and Gosden R (1998) The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol* 145:27-37.

- Plassat JL, Amlaiky N and Hen R (1993) Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Mol Pharmacol* 44:229-236.
- Ramirez MJ, Garcia-Garayoa E, Romero G, Monge A, Roca J, Del Rio J and Lasheras B (1997) VB20B7, a novel 5-HT-ergic agent with gastrokinetic activity. I. Interaction with 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors. *J Pharm Pharmacol* 49:58-65.
- Roth BL, Willins DL, Kristiansen K and Kroeze WK (1998) 5-Hydroxytryptamine₂-family receptors (5-hydroxytryptamine_{2A}, 5-hydroxytryptamine_{2B}, 5-hydroxytryptamine_{2C}): where structure meets function. *Pharmacol Therapeut* 79:231-257.
- Shen Y, Monsma FJJ, Metcalf MA, Jose PA, Hamblin MW and Sibley DR (1993) Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype. *J Biol Chem* 268:18200-18204.
- Stam NJ, Van Huizen F, Van Alebeek C, Brands J, Dijkema R, Tonnaer JA and Olijve W (1992) Genomic organization, coding sequence and functional expression of human 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptor genes. *Eur J Pharmacol* 227:153-162.
- Stricker SA and Smythe TL (2000) Multiple triggers of oocyte maturation in nemertean worms: The roles of calcium and serotonin. *J Exp Zool* 287:243-261.
- Sumner BE and Fink G (1997) The density of 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors in forebrain is increased at pro-oestrus in intact female rats. *Neurosci Lett* 234:7-10.
- Tanaka E, Baba N, Toshida K and Suzuki K (1993) Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT₂ receptor. *Life Sci* 53:563-570.
- Taussig R and Zimmermann G (1998) Type-specific regulation of mammalian adenylyl cyclases by G protein pathways. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 32:81-98.

Terranova PF, Uilenbroek JT, Saville L, Horst D and Nakamura Y (1990) Serotonin enhances oestradiol production by hamster preovulatory follicles in vitro: effects of experimentally induced atresia. *J Endocrinol* 125:433-438.

Vesela J, Rehak P, Mihalik J, Czikkova S, Pokorny J and Koppel J (2003) Expression of serotonin receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Physiol Res* 52 :223-228.

Webb RJ, Bains H, Cruttwell C and Carroll J (2002a) Gap-junctional communication in mouse cumulus-oocyte complexes: implications for the mechanism of meiotic maturation. *Reproduction* 123:41-52.

Webb RJ, Marshall F, Swann K and Carroll J (2002b) Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase a in mammalian oocytes. *Dev Biol* 246:441-454.

Yang W, Chen K, Lan NC, Gallaher TK and Shih JC (1992) Gene structure and expression of the mouse 5-HT₂ receptor. *J Neurosci Res* 33:196-204.

Footnotes

Supported by scholarships from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR) and the Université de Montréal to P.A. and by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant to F.D.

François Dubé, Ph.D., Centre de recherche du CHUM, Hôpital Saint-Luc
264, René-Lévesque Est, Montréal, Québec, Canada H2X 1P1

Figures

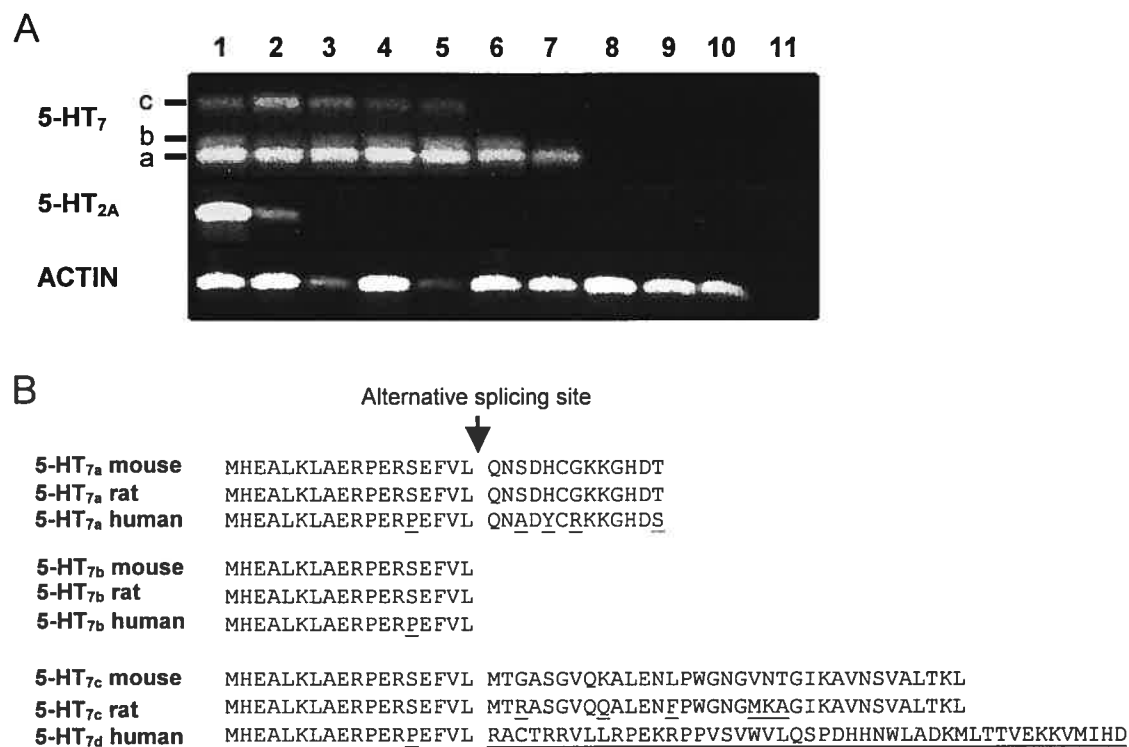


Figure 1. Expressions of 5-HT₇ and 5-HT_{2A} receptors mRNAs in cumulus cells, oocytes and embryos and C-terminal amino acid sequences of mouse, rat and human 5-HT₇ receptor isoforms. (A) RT-PCR-amplified bands for 5-HT₇ (isoforms a, b and c), 5-HT_{2A} receptors and actin control obtained with mRNA extracted respectively from (lanes 1 to 11) total ovaries (1), isolated cumulus cells (2), germinal vesicle stage oocytes (3), metaphase II oocytes (4), 1-cell (5), 2-cell (6), 4-cell (7), and 8-cell embryos (8), morulas (9), blastocysts (10) and a representative negative control sample without cDNA (11). Depicted bands, at their expected sizes as described in Materials and Methods, were the only ones detected in three to four separate determinations. (B) Comparison of the deduced C-terminal amino acid of the mouse with its rat and human homologues. Amino acid differences are underlined.

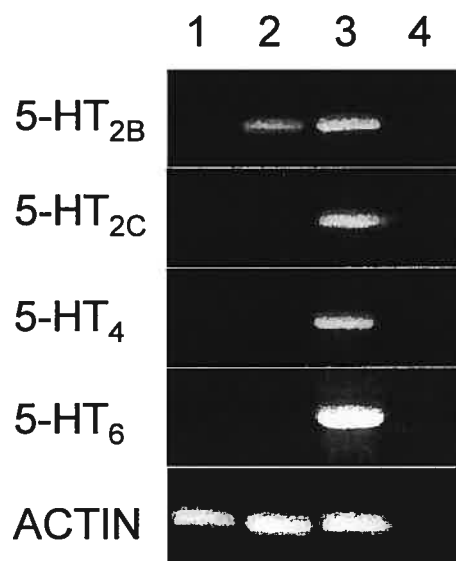


Figure 2. Expressions of 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₄ and 5-HT₆ receptor mRNAs in oocytes and cumulus cells. RT-PCR-amplified bands for 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₄ and 5-HT₆ receptors and actin control obtained with mRNA extracted respectively from (lanes 1 to 4) metaphase II oocytes (1), isolated cumulus cells (2), brain (3) and a representative negative control sample without cDNA (4). Depicted bands, at their expected sizes as described in Materials and Methods, were the only ones detected in three to four separate determinations.

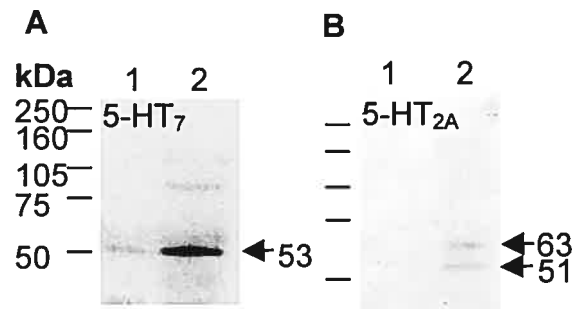


Figure 3. Expressions of 5-HT₇ and 5-HT_{2A} proteins in cumulus cells and metaphase II oocytes. Western blots against samples from isolated oocytes (1) or cumulus cells (2) showing a common band at 53 kDa with an anti-5HT₇ antibody (A) and doublet bands only in cumulus cells with an anti-5-HT_{2A} antibody (B).

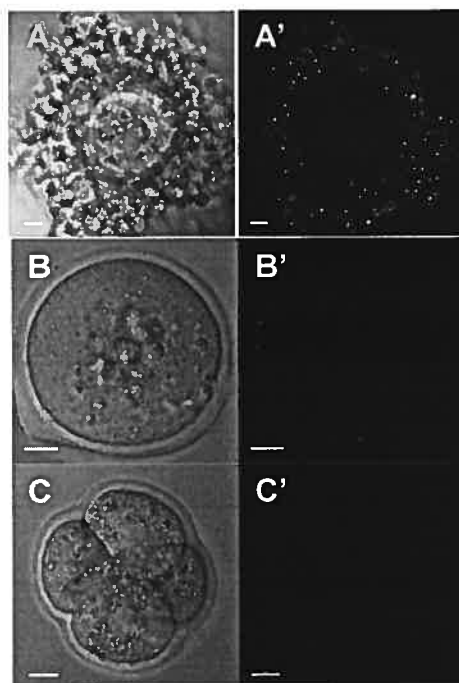


Figure 4. Expression of 5-HT_{2A} receptor protein in COCs, isolated metaphase II oocytes and early embryos. Immunofluorescence of cells prepared with an anti-5-HT_{2A} antibody (A'-C') and observed by confocal microscopy. Phase contrast (A-C) and corresponding fluorescence (A'-C') images of a mouse COC (A-A'), isolated metaphase II oocyte (B-B') and 4-cell stage embryo (C-C'). Scale bars, 10 μ m.

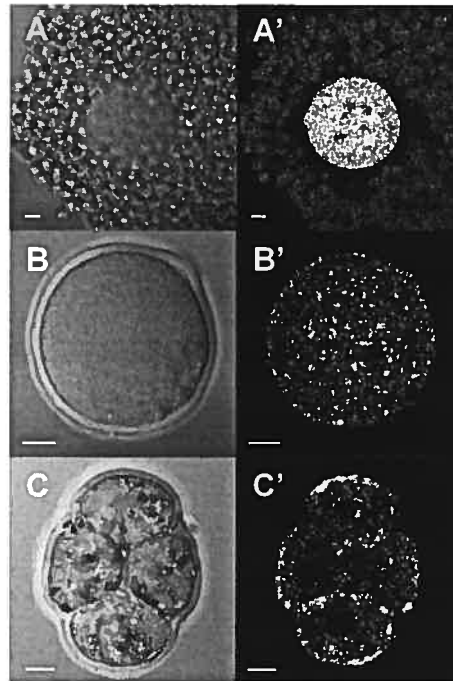


Figure 5. Expression of 5-HT₇ receptor protein in COCs, isolated metaphase II oocytes and early embryos. Immunofluorescence of cells prepared with an anti-5-HT₇ antibody (A'-C') and observed by confocal microscopy. Phase contrast (A-C) and corresponding fluorescence (A'-C') images of a mouse COC (A-A'), isolated metaphase II oocyte (B-B'), and 4-cell stage embryo (C-C'). Scale bars, 10 μ m.

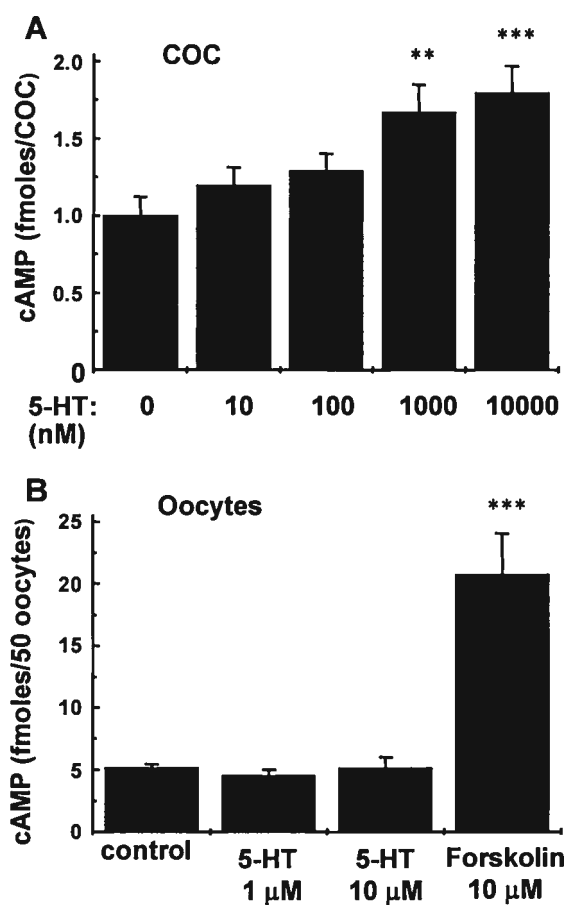


Figure 6. Effect of 5-HT on the cAMP content of mouse COCs and isolated metaphase oocytes. COCs (A) and metaphase II oocytes (B) were submitted to different concentrations of 5-HT for 5 min in M2 medium containing 200 μ M IBMX. A 10- μ M forskolin treatment was included in the oocyte experiments. Mean results (\pm S.E.M.) of at least 3 duplicate experiments. **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$ compared to the control.

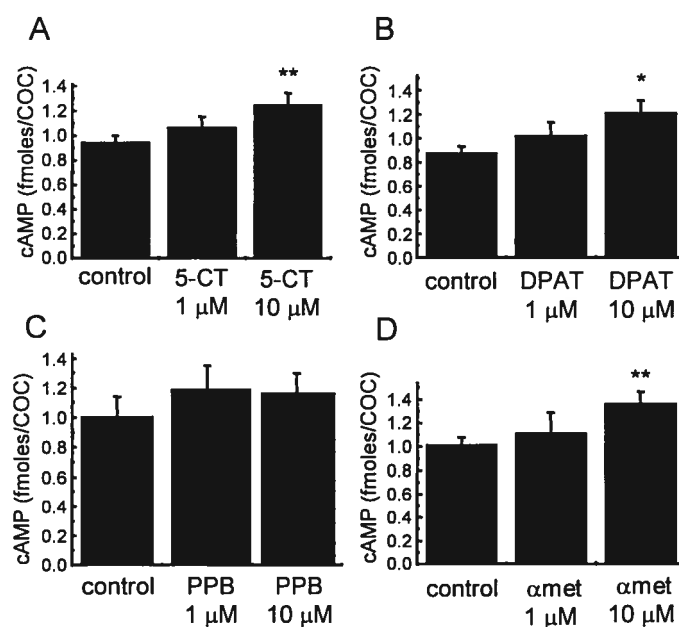


Figure 7. Effect of 5-HT agonists on the cAMP content of mouse COCs. COCs were treated with 5- CT (A), 8-OH DPAT (B), PPB (C) or α -methyl-5-HT (D), for 5 min in M2 medium containing 200 μ M IBMX. Mean results (\pm S.E.M.) of at least 3 duplicate experiments. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ compared to control.

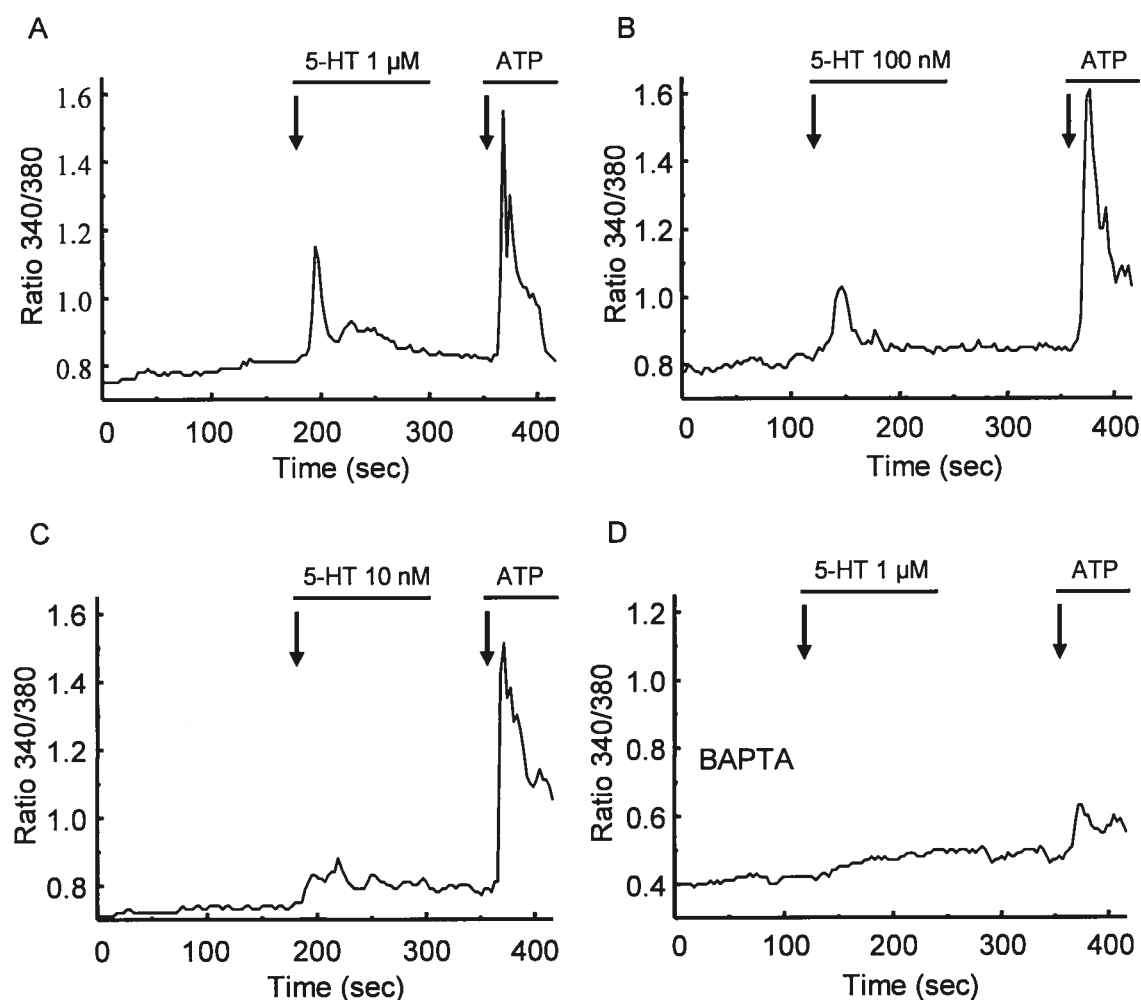


Figure 8. Effect of 5-HT on resting Ca^{2+} concentration in mouse cumulus cells. A typical trace of a cumulus cell response is shown when perfused with M2 medium containing 1 μM (A), 100 nM (B) or 10 nM 5-HT (C). Pre-treatment of the cumulus cells with 50 μM BAPTA AM before the addition of 1 μM 5-HT blocks the Ca^{2+} increase (D). 200 μM ATP was added at the end of each experiment as a positive control. Agonist perfusion time is indicated by the arrow and its duration, by the bar.

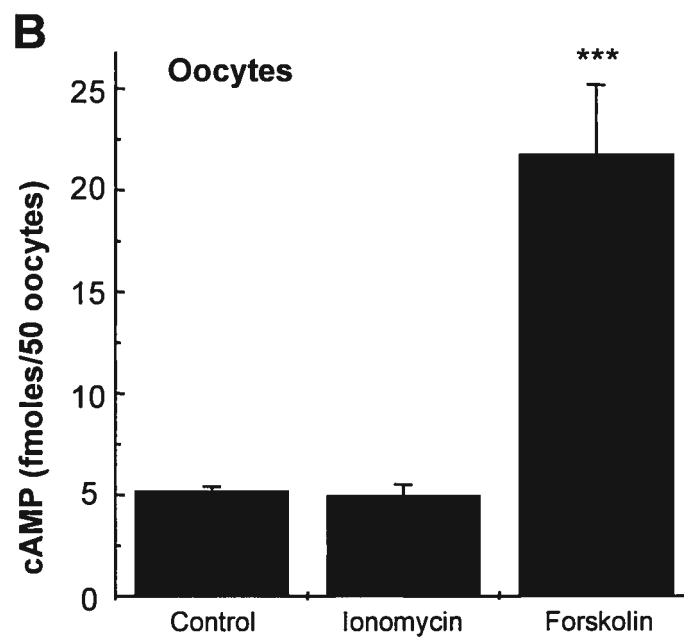
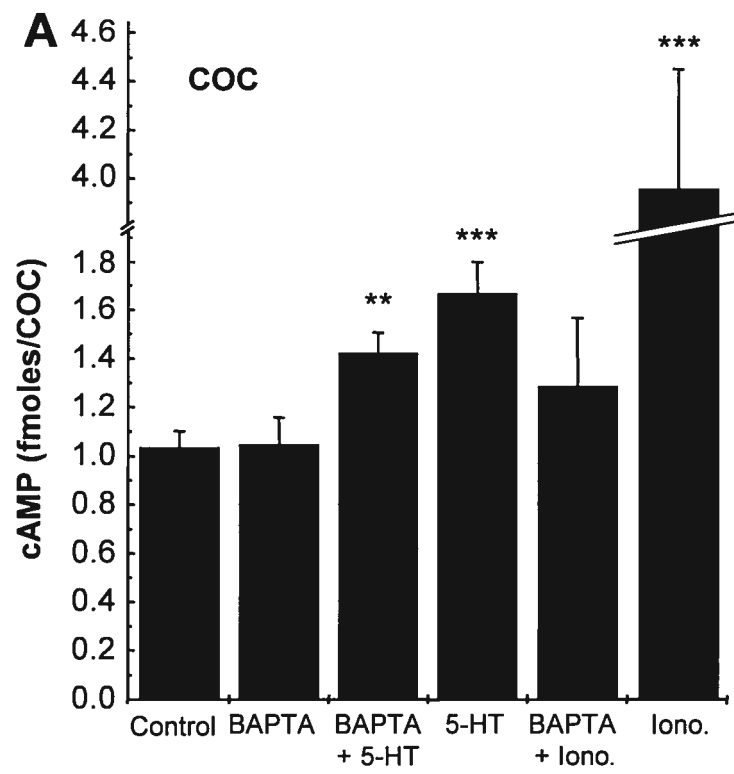



Figure 9. Cross-talk between intracellular calcium concentration and cAMP in mouse COCs and metaphase II oocytes. Groups of cells (A: COCs; B: metaphase II oocytes) were treated with 1 μ M 5-HT, 5 μ M ionomycin or 10 μ M forskolin for 5 min in M2 medium containing 200 μ M IBMX. Under BAPTA-containing conditions, the cells were pre-treated for 30 min in 50 μ M BAPTA-AM before the 5-min treatment. Mean results (\pm S.E.M.) of at least 3 duplicate experiments. **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$ compared to the control.

Agonist	Cell Type	Number of experiments	Number of cells	Number of reacting cells	% of reacting cells	Amplitude Mean response (ratio 340/380) +/- SEM
5-HT 1 μ M	Cumulus	7	336	189	56.3	0.34 +/- 0,02
5-HT 100 nM	Cumulus	5	272	128	47.1	0.21 +/- 0,02
5-HT 10 nM	Cumulus	3	115	36	34.5	0.14 +/- 0,01
5-HT 1 μ M + BAPTA	Cumulus	3	211	8	3.8	0.09 +/- 0,01
5-HT 10 μ M	MII oocyte	3	7	0	0	-

Table 1 : Ca^{2+} measurement, following 5-HT perfusion, in mouse cumulus cells and oocytes.



4.3 La sérotonine et son transport sensible aux antidépresseurs dans les complexes ovocyte-cumulus et embryons de souris

Manuscrit publié dans la revue *Biology of Reproduction*

En août 2005, Vol 73, pages 358-365

Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos¹

Pascal Amireault² and François Dubé^{2,3}

²Département d'obstétrique-gynécologie, Université de Montréal and Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôpital Saint-Luc, 264 boul. René-Lévesque est, Montréal, Québec, Canada H2X 1P1

³Corresponding author and to whom reprint requests should be sent. Phone number: (514) 890-8310, ext. 35819; Fax number: (514) 412-7314; [REDACTED]
[REDACTED]

Short title: Serotonin transport in mouse oocytes

Summary sentence: Serotonin and its antidepressant-sensitive transport, shown here in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos, reveal that a serotonergic network is likely to regulate much earlier developmental stages than suspected until now.

¹Supported by scholarships from the Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ) and Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR) and the Université de Montréal to P.A. and by a Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC-Canada) grant to F.D.

Abstract

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT), a neurohormone found in various non-neural tissues, including the gonads of many invertebrates, regulates spawning and oocyte meiotic maturation. The possibility that a local serotonergic network might also exist in the female gonads of vertebrate species, including mammals, remains poorly documented. To clarify this possibility, we investigated mouse cumulus cells, oocytes and embryos for 3 key serotonergic components, namely 5-HT itself, the rate-limiting enzyme for its production, tryptophan hydroxylase 1 (TPH1), and the 5-HT-specific transporter (SLC6A4) required for modulating its cellular effects. Using a combination of reverse transcription-polymerase chain reaction analysis and immunofluorescence confocal microscopy, we showed that mouse cumulus cells, oocytes and embryos contain 5-HT and SLC6A4, while only cumulus cells possess the 5-HT-producing enzyme TPH1 and may thus be the local source of 5-HT observed in their neighbouring cells. With a semi-quantitative assay in single cells, we demonstrated that 5-HT can actively be taken up by isolated oocytes when it is supplied exogenously in vitro. This 5-HT transport in isolated oocytes is driven by a classical serotonin transporter, expressed up to the blastocyst stage, that is sensitive to the antidepressants fluoxetine and fluvoxamine, that belong to the selective serotonin reuptake inhibitor family. Altogether, our results show that 5-HT may be produced locally by cumulus cells and that it can be actively taken up by mammalian oocytes and embryos, as part of a likely larger serotonergic network possibly regulating various developmental processes much earlier than previously thought.

Introduction

Serotonin (5-HT) is known to regulate spawning and to induce oocyte meiotic maturation in a number of invertebrates, such as molluscs and nemerteans [1-3]. By analogy with these invertebrate species, and based on several independent observations, it has long been suspected that 5-HT may have a role as local regulator of various early developmental events in mammalian species. First, 5-HT itself can be detected in female rodent genital tracts [4] and in human follicular fluid [5]. A 5-HT effect on reproductive tissues is illustrated by its stimulation of steroidogenesis in human [6], rat [7] and hamster [8] granulosa cells, this action being possibly mediated through HTR7 as identified in cultured human granulosa-lutein cells [9]. The oocyte itself could be a target for 5-HT which elicits typical intracellular Ca^{2+} oscillations, similar to those seen after fertilization, but sensitive to HTR2A antagonists, in isolated hamster metaphase II (MII) oocytes [10]. Moreover, it has been shown that the sensitivity of hamster oocytes to produce Ca^{2+} spikes upon 5-HT addition differs according to the oocyte maturation stage [11]. Also, recently, the *Htr1d* mRNA was detected in mouse MII oocytes and pre-implantation embryos and was suggested to regulate cleavage divisions of embryos cultured in vitro [12]. Other studies have reported the possible involvement of serotonin in oocyte maturation and early embryogenesis [13, 14] but they lacked clear demonstrations of endogenous serotonergic components in these cells. More recently, however, a direct suggestion was made that an unidentified receptor, possibly related to HTR7 and sensitive to the serotonin antagonist ritanserin, could be involved in maintaining prophase I arrest in both *Xenopus* and mouse oocytes [15]. The potential involvement of 5-HT, not only in meiotic maturation but also in several other aspects of follicular growth or early embryogenesis, is further suggested by our recent demonstration of HTR7 or HTR2A in mouse cumulus cells, oocytes and early embryos (Amireault and Dubé, submitted). Altogether, these recent reports point to the possibility that a complete and functional serotonergic network might regulate several, though as yet not fully characterized, processes of ovarian and oocyte physiology.

To be functional, a local serotonergic network requires that 5-HT reaches target cells through neural innervation, vascular irrigation or, more directly, be produced locally by

surrounding cells. While serotonin has been reported in the ovaries, oviducts, uterus and even oocytes and pre-implantation embryos [16] of some rodents, its origin, although tentatively ascribed to mast cells [4], has remained obscure. The capacity of producing 5-HT by given cells or tissues is conferred by the enzyme tryptophan hydroxylase (TPH), a member of the tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylase family, that catalyzes the conversion of tryptophan into 5-hydroxytryptophan, the rate-limiting step in 5-HT synthesis [17]. Tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) has long been considered as the single isoform of TPH until the recent cloning of a second isoform, TPH2 [18]. These authors also showed that TPH1 is the isoform expressed in peripheral tissues while TPH2 is expressed solely in the brain [18]. *Tph1* cDNAs of various mammalian species, including humans, rats and mice, have been cloned and sequenced [19-21]. Interestingly, *Tph1* mRNA, along with 5-HT, has recently been detected in epithelial cells of the mouse mammary gland, supporting a central regulative role for this enzyme in local 5-HT production within a peripheral autonomous serotonergic network [22]. However, the activity or presence of TPH has never been reported in any ovarian tissues which would have substantiated their capacity to produce serotonin locally.

Besides 5-HT itself and its receptors, local serotonergic regulation also requires an active serotonin uptake mechanism to ensure removal of 5-HT from the cellular environment of 5-HT-sensitive cells when it is no longer needed. This function of 5-HT reuptake, in vertebrate species, is normally achieved by a conserved serotonin transporter (SLC6A4, also known as SERT) that is a member of Na⁺- and Cl⁻-dependent transporters comprising also noradrenaline and dopamine transporters. *Slc6a4* cDNA encodes a protein of 630 amino acids which contains 12 potential transmembrane domains and potential N-glycosylation and phosphorylation sites permitting regulated trafficking to the membrane [23]. In the central nervous system, SLC6A4 is expressed in presynaptic neurons where it removes 5-HT after its vesicular release, but it is also found in the gastrointestinal tract [24], in platelets [25], lymphocytes [26] and the placenta [27]. In addition to its role in removal of extracellular 5-HT, SLC6A4 has also been shown to be essential, in platelets, for a newly discovered signaling process called "serotonylation" and requiring intracellular accumulation of 5-HT [28].

SLC6A4 is the target of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) which include an array of widely-used antidepressants for human healthcare, such as fluoxetine (Prozac) and fluvoxamine (Luvox) [29]. SSRIs have a high affinity for SLC6A4 and are used to treat psychiatric disorders associated with the serotonin system, including anxiety, obsessive-compulsive symptoms and premenstrual dysphoric disorders [30].

The aim of the present work was to clarify scattered earlier reports of serotonergic components in various regions of female reproductive organs in diverse mammalian species. To do so, we focused on a more restricted cellular system, the mouse cumulus-oocyte complex, and on the characterization of 3 serotonergic effectors: 5-HT itself, TPH1 and SLC6A4. Here, we show that all these 3 serotonergic effectors are present in mouse cumulus cells, oocytes or embryos and are components of a local serotonergic network exhibiting potential 5-HT-producing capacity and active 5-HT uptake. Our study thus supports the view that a local serotonergic network could serve several functions pertaining to cell communications required for follicular growth, oocyte meiotic maturation, or early embryogenesis.

Materials and Methods

Oocyte and embryo collection. Fully-grown germinal vesicle (GV) stage oocytes, ovulated MII-arrested oocytes and pre-implantation embryos at various stages were obtained from 3-4-week-old female B6C3F1 mice (Charles River) after standard gonadotropin injection. For GV-stage oocytes, the mice were primed with 5 IU of equine gonadotropin (eCG, Sigma), and cumulus-enclosed, fully-grown oocytes were collected 46-48 h later by puncturing of antral follicles with a 30-gauge needle, under a dissecting microscope, in M2 medium containing 100 μ M 3-isobutyl 1-methylxanthine (IBMX). When needed, the cumulus cells were removed by repeated pipetting with a small bore pipette. For MII-arrested oocytes, the mice were primed with 5 IU of eCG, followed (44-48 h later) by a 5 IU human chorionic gonadotropin (pregnyl-hCG, Organon Canada) injection, and cumulus-enclosed oocytes (COC-MII) were collected from the oviduct 18-20 h later in M2 medium. When needed, the cumulus cells were dispersed in M2 medium containing 10 mg/ml bovine testis hyaluronidase (Sigma), and the oocytes were washed and collected in M2 medium. For embryos, female mice were submitted to the gonadotropin protocol and were allowed to mate with a male the night after the second injection. Embryos were collected by flushing the oviducts or uterus with M2 medium via a 30-gauge needle mounted on a syringe. The timing of embryo collection was as follows: 1-cell, 19 h post-hCG; 2-cell, 43 h; 4-cell, 50 h; 8-cell, 67 h; morula, 74 h; blastocysts, 91 h. All animal experiments were approved by the Institutional Animal Use and Care Committee and were consistent with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

In vitro culture of COCs, oocytes and embryos for 5-HT detection. MII-arrested oocytes, COC-MII, 4-cell embryos and blastocysts were collected as described above and cultured in small Petri dishes containing a drop of medium, under paraffin oil, equilibrated previously in a humidified chamber at 37°C and 5% CO₂. The cells were incubated for 20 min in M16 medium alone, in M16 medium containing 500 nM 5-HT or in M16 medium containing 500 nM 5-HT and 1 μ M fluvoxamine. In the

fluvoxamine-containing condition, the cells were pre-incubated for 15 min in fluvoxamine alone before being transferred to medium containing also 5-HT. After incubation, the cells were immediately transferred to a paraformaldehyde solution and submitted to the indirect immunofluorescence protocol. Each experiment was performed at least 3 times with at least 10 cells/condition.

mRNA isolation and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Collected cells were incubated in acidic Tyrode solution (Sigma) to remove the zona pellucida of GV-oocytes, MII oocytes, and 1-cell embryos. The cells were kept in a minimum of M2 medium at -80°C until mRNA isolation. mRNAs of 10 oocytes, 10 embryos or cumulus cells from 30-50 COC-MII were isolated according to the micro scale protocol with the Dynabeads mRNA direct kit (Dyna). The mRNAs were reverse transcribed using Superscript II enzyme (Gibco BRL) in a 20 µL reaction at 42°C, for 45 min, to construct a cDNA library immobilized on beads, following the manufacturer's specifications. The first PCR run (50 µL) was performed on cDNA beads in suspension. The PCR program, of 26 cycles with a hot start, consisted of denaturation of 90 sec at 95°C, primer annealing of 90 sec at 65°C, and primer extension of 90 sec at 72°C (last primer extension of 15 min). The second PCR run was performed with 1/10 of a µL of products from the first amplification and the same PCR program (28 cycles). For *Slc6a4*, 2 pairs of primers were used in a nested PCR strategy to produce amplicons of 559 bp (forward 5'-CCAACTACTTCGCCCAGGACAACATCAC-3' and reverse 5'-TCTTCGTTCCCTCATCTCAGCCATGTAGCC-3') and 533 bp (forward 5'-TCGGACACGTCTTCGTTCCCTCATCTCAG-3' and reverse 5'-GACCAACATCACCTGGACACTCCATTCCAC-3'). For *Tph1*, 2 pairs of primers in a nested PCR strategy produced amplicons of 563 bp (forward 5'-GACATCGGATCAGAAGACTCCC-3' and reverse 5'-CGTGAATTCAATCTTGGGAATGG-3') and 389 bp (forward 5'-CACCATGATTGAAGACAACAAGG-3' and reverse 5'-CATACAACAGCACTCTGTTGGCG-3'). Primers for *Actb* as positive controls yielded 540-bp (forward 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3' and reverse 5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3') and 277-bp (forward 5'-

TGTGATGGTGGGAATGGGTCAGAAGGAC-3' and reverse 5'-TACGTACATGGCTGGGGTGTGAAGG-3') amplicons. 25 µL of each reaction was loaded on agarose gel stained with ethidium bromide. Each amplification was executed at least 3 times yielding similar results. All PCR products obtained were cloned in pCRII (Invitrogen) and sequenced on both strands by the Université Laval sequencing service to confirm the sequence.

Experimental conditions of the 5-HT uptake study (Fig. 5). MII-arrested oocytes were cultured in M16 medium containing 500 nM 5-HT creatinine sulphate (5-HT, Sigma) for 0, 2, 5, 10 or 20 min. In other experiments, MII-arrested oocytes were cultured for 10 min in M16 medium containing 0-1000 nM 5-HT. MII-arrested oocytes were also cultured for 10 min in M16 medium containing 500 nM 5-HT and 0-1000 nM fluoxetine hydrochloride (fluoxetine, Sigma) after 15-min pre-incubation with fluoxetine alone. Controls with different concentrations of fluoxetine alone and without 5-HT or fluoxetine were also included. Next, MII-arrested oocytes were cultured for 10 min in M16 medium containing 500 nM 5-HT and 0-1000 nM fluvoxamine (Sigma) after 15-min pre-incubation with fluvoxamine alone. Controls with different concentrations of fluvoxamine alone and without 5-HT or fluvoxamine were also included. Controls for the reversibility of fluoxetine and fluvoxamine inhibitions were performed by washing MII-arrested oocytes 3 times (10 min each) in M16 medium, after a 15-min pre-incubation in 1 µM of each inhibitor alone, and finally incubating them after for 10 min in M16 medium containing 500 nM 5-HT.

In all experiments, the oocytes were transferred to a paraformaldehyde solution and submitted to the indirect immunofluorescence protocol for 5-HT detection. Each of these experiments included at least 10 oocytes/condition, pooled from 3 to 6 mice, and was performed at least 3 times for a minimum total of 30 oocytes/condition.

Indirect immunofluorescence confocal microscopy for 5-HT and SLC6A4

detection. Oocytes and embryos were collected and treated as described above, then fixed in fresh Dulbecco phosphate-buffered saline (D-PBS) paraformaldehyde 4% for 30 min at room temperature. They were washed 3 times for 5 min in D-PBS, before a 1-h

blocking step in D-PBS/milk 5%/Triton 0.5%/normal goat serum (NGS) 5%. They were next incubated overnight at 4°C with a primary antibody raised against 5-HT (1/25,000, Incstar) in D-PBS/milk 1%/Triton 0.1%/NGS 1%. After 3 washes in D-PBS, they were incubated for 1 h at room temperature in a Cy-3-conjugated goat anti-rabbit antibody (1/2,000, Jackson ImmunoResearch), and washed 3 times in D-PBS. Finally, MII-arrested oocytes, COC-MII and 4-cell embryos were mounted with Fluoromount (Electron Microscopy System), and GV-stage oocytes and blastocysts were mounted with 50% glycerol in D-PBS. Images were collected with a Zeiss Axiovert 100M microscope coupled with the LSM510 system. Competition controls were included for each cell type and culture condition tested. In these controls, the first antibody (1/25,000) was incubated at room temperature, with gentle shaking, in D-PBS/milk 1%/Triton 0.1%/NGS 1% with 5-HT-BSA (10 µg/µL) for 4 h before overnight incubation with the cells. Controls without the first antibody were also included for each cell type tested.

For the 5-HT uptake study, fluorescence quantification of individual oocytes was undertaken with the LSM510 program. A circle was drawn around each oocyte, and the mean intensity of each pixel inside this circle served as a measure of 5-HT incorporation. These data were then analyzed statistically.

The procedures for the immunodetection of SLC6A4 were identical to those deployed for the detection of 5-HT, but with a different first antibody. A rabbit anti-rat antibody directed against amino acids 579-599 (Oncogene) was used at a 1/5,000 dilution. Controls without the first antibody were also included for each cell type tested.

Western blotting. For each detection of TPH or SLC6A4, approximately 300 oocytes and their corresponding surrounding cumulus cells were lysed in 30 µL of 0.5% SDS and kept at -80°C until electrophoresis. The frozen samples were diluted in 4X sample buffer, loaded on 7.5% SDS-polyacrylamide gel, run at 200 V for 45 min and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. The membrane was blocked with 5% milk and 0.1% Tween 20 in D-PBS for 1 h at room temperature before overnight incubation at 4°C, in fresh blocking solution containing the appropriate diluted first antibody. The membrane was washed 3 times in 0.1% Tween 20 in D-PBS and incubated in fresh

blocking solution containing the appropriate diluted second antibody. Finally, the membrane was washed several times in 0.1% Tween 20 in D-PBS before the detection protocol, using the enhanced chemiluminescence plus assay kit (Amersham). The same SLC6A4 (1/20,000) antibody as for indirect immunofluorescence detection was employed for Western blotting with a goat anti-rabbit-horse radish peroxidase (HRP) secondary antibody (1/20,000, Bio-Rad). TPH1 was detected with a sheep anti-rabbit antibody (Chemicon) at 1/300 dilution and a donkey anti-sheep-HRP secondary antibody (1/20,000, Bio-Rad).

Hamster oocyte collection. Hamsters were primed with 25 IU of eCG, followed by a 25-IU hCG injection 52 h later, and cumulus-enclosed oocytes were collected from the oviduct 18 h later in M2 medium. The cumulus cells were dispersed in M2 medium containing 10 mg/ml bovine testis hyaluronidase, and the oocytes were washed and collected in M2 medium. The oocytes were then submitted to the indirect immunofluorescence confocal microscopy protocol for 5-HT detection.

Statistical analysis. Data were compared statistically by Kruskal-Wallis One-Way ANOVA. Groups were then compared by Dunn's method. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Using a specific anti-5-HT antibody, followed by indirect immunofluorescence observations of serial optical sections under confocal microscopy, we detected 5-HT in COCs, isolated mature MII oocytes and GV-stage oocytes (Figs. 1 A-A', D-D' and G-G' show phase contrast and corresponding immunofluorescence images). Interestingly, oocyte labeling with the anti-5-HT antibody was enhanced considerably when these cells were pre-incubated in medium containing 500 nM 5-HT for 20 min, further confirming the antibody's specificity for 5-HT (Fig. 1 B, E and H). Similarly, 5-HT immunoreactivity was observed in cumulus cells, either isolated (not shown) or in intact COCs (Fig. 1 A-A') and was also enhanced by incubation in the presence of 5-HT (Fig. 1 B). No cell labeling was found when the anti-5-HT antibody had been previously depleted by pre-incubation with a BSA-5-HT complex (Fig. 1 C, F and I), or when only a secondary antibody was used (data not shown).

These observations that 5-HT is normally present within mammalian cumulus cells and oocytes and that it can accumulate within them, when 5-HT is supplied exogenously, suggest possible local production of serotonin and an active 5-HT uptake mechanism. We, therefore, examined whether the key enzyme TPH1 [14], found only in 5-HT-synthesizing cells, and the classical mammalian serotonin transporter, known to drive 5-HT uptake in other cells, could be expressed in oocytes, embryos or cumulus cells. Figure 2 shows the amplified bands seen after nested RT-PCR analysis, using oligonucleotides specific for *Slc6a4* or *Tph1* with mRNA extracted from ovaries, cumulus cells, oocytes and embryos at various stages. As depicted, bands of expected sizes (verified by cloning and sequencing) revealed *Tph1* mRNA in total ovaries and isolated cumulus cells, but not in isolated oocytes or embryos at any stage, whereas *Slc6a4* mRNA was detected in all cell types examined, including embryos up to the blastocyst stage (Fig. 2). No other contaminating bands were found by RT-PCR analysis.

Western blotting with antibodies specific for either TPH1 or SLC6A4 was then performed, and confirmed the presence of SLC6A4 in isolated oocytes and cumulus cells, whereas TPH1 was detected only in cumulus cells, with both proteins at expected

size ranges co-migrating with their counterparts from brain samples (Fig. 3A and B). An immunofluorescence study with the same anti-SLC6A4 antibody also confirmed positive SLC6A4 immunoreactivity in COCs, isolated MII oocytes as well as in 4-cell embryos and blastocysts (Fig. 4). While anti-SLC6A4 labeling was spread over the surface of cumulus cells and MII oocytes in a punctate pattern, it appeared more localized in patches in 4-cell stage embryos, with strong labeling of polar bodies, and also in blastocysts in which it was restricted to distinct spots of the trophectoderm (Fig. 4 A'-D').

Based on the observed increase in immunolabeling by the anti-5-HT antibody when cells were incubated with exogenous 5-HT (Fig. 1) and the demonstration that both SLC6A4 mRNA (Fig. 2) and protein (Fig. 3) were present in oocytes and embryos, we designed an experimental approach to more directly characterize the activity of 5-HT transport into isolated MII oocytes. This was performed by incubating MII oocytes in the presence of externally-added 5-HT and assessing its internal accumulation by a semi-quantitative assay, with fluorescence intensity being measured in our immunological detection of cellular 5-HT by confocal microscopy (Fig. 5, see Materials and Methods). Figure 5A illustrates the linear uptake of exogenous 5-HT (500 nM) by isolated MII oocytes over a 20-min incubation. When MII oocytes were incubated with varying concentrations of 5-HT over a 10-min period, a typical saturation curve resulted with a K_m for this SLC6A4 estimated to be 280 nM (Fig. 5B). 5-HT uptake by oocytes was also found to be abolished by low temperature (4°C), further suggesting its enzymatic nature (Fig. 5C). The latter experiments thus establish the specificity and sensitivity of our assay of 5-HT uptake by oocytes.

To further verify that this 5-HT uptake occurs through a classical serotonin transporter, we tested the effects of SSRIs comprising several different antidepressants that can reduce or abolish SLC6A4 activity. One such widely used SSRI, fluoxetine (Prozac), was found to inhibit 5-HT uptake by MII oocytes in a dose-dependent manner with a calculated IC_{50} of 355 nM (Fig. 5D), confirming the involvement of a classical serotonin transporter. Similarly, another SSRI, fluvoxamine (Luvox), was even more potent in suppressing 5-HT uptake with a calculated IC_{50} of 6 nM (Fig. 5E). These inhibitions were reversible upon washing of the cells (Fig. 5F), and active SSRI concentrations were

in the usual range of specificities reported in other cells [26]. Control oocytes incubated in fluoxetine or fluvoxamine alone without added 5-HT displayed fluorescence levels not statistically different from those of untreated oocytes (Fig. 5F). We also detected endogenous 5-HT in 4-cell stage embryos and 4-day-old blastocysts (Figs. 6A, A' and D,D' show phase contrast and corresponding immunofluorescence images). Embryo labeling with the anti-5-HT antibody was also enhanced when the embryos were pre-incubated in medium containing 500 nM 5-HT for 20 min (Fig. 6B,E). No cell labeling was found when the anti-5-HT antibody had been depleted previously BSA-5-HT complex, or when only a secondary antibody was used (data not shown). We also confirmed fluvoxamine-sensitive 5-HT uptake in 4-cell stage embryos as well as in blastocysts (Fig. 6C,F). Moreover, we performed some preliminary experiments demonstrating that incubating MII oocytes in the presence of fluvoxamine at 1 μ M did not result in reduced fertilization upon insemination and also that embryos progressed normally, as compared to controls, from 2-cell to the blastocyst stage when cultured in vitro in the continuous presence of fluvoxamine (data not shown). These experiments suggest that 5-HT transport is not required for either fertilization or pre-implantation development and also confirm that SSRIs have no toxic effects in these cells.

To determine the extent to which our observations could apply to other mammalian species besides the mouse, we observed the presence of 5-HT in hamster oocytes that can also actively take up external 5-HT (Fig. 7), indicating the probable universality of such a serotonergic network in mammalian COCs. Altogether, our results suggest that, on the one hand, the presence of the 5-HT-synthesizing enzyme TPH1 in cumulus cells makes them the best candidates for the origin of 5-HT, seen also in neighbouring oocytes. On the other hand, the absence of TPH1 in oocytes and embryos renders SLC6A4 the likely candidate for transporting 5-HT into these cells.

Discussion

Our work establishes unequivocally, for the first time, the presence of TPH1, SLC6A4 and early 5-HT transport within mammalian cumulus cells, oocytes or early embryos, which are likely part of a regulatory local serotonergic network. In addition, we confirmed the presence of 5-HT in oocytes and early embryos [16] and demonstrated that cumulus cells also contain 5-HT. It was thought, until now, that mast cells were the only source of 5-HT in the ovary [4] but our demonstration of TPH1 and 5-HT in cumulus cells suggests that these cells are also a likely ovarian source of 5-HT. Indeed, similar assumptions of local 5-HT synthesis by peripheral cells, based on the presence of both 5-HT and TPH mRNA and/or protein, were proposed for gut enterochromaffin cells [31], embryonic stem cells [32] and epithelial cells of the mammary gland [22]. Further studies, such as in vitro activity assays, would more firmly establish this assumption for cumulus cells but the presence of both TPH1 mRNA and protein makes them the most plausible source for, at least, the 5-HT detected in follicular fluids [5] and oocytes [this work, 16], even though additional indirect sources cannot be excluded at this time. Also, an intra-follicular source of 5-HT could allow a bi-directional communication between ovarian steroids and a follicular serotonergic network. In this respect, it is noteworthy that in macaque and guinea pig dorsal raphe, TPH mRNA and protein expressions are stimulated by estrogen [33]. If a similar mechanism was active in cumulus cells, their production of 5-HT could be regulated by local estrogen levels. Conversely, since 5-HT stimulates estradiol and progesterone secretions by rat [7] and hamster [8] follicles, and by cultured porcine [34] and human [5, 6, 9] granulosa cells, cumulus cells could provide 5-HT-driven autocrine or paracrine regulation of local steroidogenesis. A potential link between serotonergic regulation and local steroidogenesis, to promote folliculogenesis, is further suggested by the observation that total ovarian 5-HT levels fluctuate in phase with the estrous cycle in rats [35]. Interestingly, an unsuspected autonomous peripheral serotonergic network has recently been uncovered in the mammary gland, with *Tph1* mRNA expression, influenced by prolactin, leading to coordinated local production, by epithelial cells, of 5-HT which, in turn, exerts autocrine/paracrine functions in the mammary gland development [22].

Likewise, TPH1 expression in follicles might thus be involved in the regulated production of local 5-HT with potential, yet uncovered, effects on follicular development.

In addition to cumulus cells potentially producing 5-HT in a coordinated fashion, the functional SLC6A4 expressed in oocytes and cumulus cells would permit the reuptake of 5-HT released in the extracellular space, and would contribute to further regulate the magnitude, temporal and spatial distribution of 5-HT produced locally and, hence, its possible interaction with membrane located receptors such as the HTR1D [12] and HTR7 expressed in oocytes or the HTR7 and HTR2A expressed by cumulus cells (Amireault and Dubé, submitted). Alternatively, 5-HT uptake by SLC6A4 could allow its interaction with 5-HT receptors located to intracellular structures of oocytes, embryos or cumulus cells, as shown for the HTR7 and HTR2A in some regions of the rat brain [36, 37]. Along this line, the possibility that intracellular 5-HT might affect early embryonic development was proposed long ago [13,14] but this hypothesis was lacking clear experimental evidence or any known supportive mechanism. Interestingly, this early proposal gains a renewed interest in the light of our work, but also of the recent discovery of a new receptor-independent signaling process set by intracellular 5-HT and involving an active role for SLC6A4-driven 5-HT uptake [28]. Indeed, this signaling mechanism called "serotonylation", and consisting in the transamidation of 5-HT to GTPases rendering them constitutively active, was shown to regulate alpha-granule exocytosis from platelets and to require prior SLC6A4-induced intracellular accumulation of 5-HT [28]. Whether this signaling mechanism is of widespread occurrence remains to be seen but it should predictably be predominant in peripheral tissues exhibiting a local serotonergic network, including SLC6A4-driven 5-HT transport, such as shown here for the mammalian follicle. From previous studies, SLC6A4 was believed to appear no earlier than ~ day-10 of rodent embryonic development [38, 39] and its involvement at much earlier, even pre-fertilization, stages was thus not investigated until now. This implies that SSRIs, through their action on SLC6A4, could impact on reproductive processes at much earlier stages than expected and underscores that antidepressants of the SSRI family, as well as other serotonergic

drugs of wide use in human healthcare, deserve new evaluations for their potential effects on reproductive functions at early stages.

The action of 5-HT on any early reproductive processes should involve at least one of its receptors expressed in these cells. Indeed, we recently found that mouse oocytes express the HTR7 and that cumulus cells express two 5-HT receptors, the HTR7 and HTR2A subtypes (Amireault and Dubé, submitted). We also demonstrated that 5-HT could regulate the cAMP and intracellular calcium levels of cumulus cells, thus confirming the expression of a complete and autonomous serotonergic network in mouse COCs (Amireault and Dubé, submitted). The present work suggests that an autocrine or paracrine cell communication system based on 5-HT could be involved in several key reproductive processes driven by these cells, including follicular growth and steroidogenesis, ovulation, fertilization and early embryonic development. In a preliminary study, we performed some in vitro fertilization experiments which showed no effect of 5-HT or fluvoxamine on this process (data not shown). Since such in vitro studies can only partially approximate physiological conditions, we cannot exclude an in vivo serotonergic regulation of fertilization, but an intra-ovarian role seems more likely. Such an intra-ovarian role is suggested for other animals, such as the teleost *Fundulus heteroclitus*, in which 5-HT inhibits the $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17,20\beta$ P)-induced resumption of oocyte meiosis of both denuded and follicle-enclosed oocytes [40]. Even though these pharmacological studies did not identify the 5-HT receptor subtype involved, they demonstrated clearly that 5-HT increased the cAMP level of follicles and that it blocked the cAMP decrease observed after $17,20\beta$ P treatment [41]. Along this line, a recent work proposes that an unidentified receptor, sharing common properties with the HTR7 and sensitive to the serotonin antagonist ritanserin, could be involved in maintaining prophase I arrest in both *Xenopus* and mouse oocytes [15]. On the other hand, the Gi-coupled HTR1D [12] and Gs-coupled HTR7 (Amireault and Dubé, submitted) were reported in mouse oocytes and these receptors are, respectively, negatively or positively coupled to adenylate cyclase, and thus directly regulate intracellular cAMP levels through binding of their ligand. It has been known for a long time that the reinitiation of meiotic maturation in prophase I-arrested oocytes, as triggered either by an LH surge in mice or by progesterone in frogs, is linked to a

decrease of intra-oocyte cAMP [42] while maintenance of oocytes in prophase I requires constant Gs protein activity and high cAMP content, in both frog and mouse oocytes [43, 44]. This constant Gs protein activity has recently been shown to be maintained by the orphan GPR3 receptor since oocytes from *Gpr3* knockout mice resume meiosis within antral follicles [45]. Nevertheless, it remains possible that oocyte HTR1D and HTR7, through control of cAMP levels, could be involved in the fine-tuning of the meiotic maturation process or, alternatively, be involved in later steps of oocyte and embryo development. As for a possible role of 5-HT in early embryogenesis, we performed experiments showing that 5-HT or fluvoxamine had no effect on the percentage of embryos reaching the blastocyst stage when cultured in vitro (data not shown). However, 5-HT was recently shown to lower the mean cell number of blastocysts in mouse embryos cultured in vitro, thus suggesting a negative effect of 5-HT on early cleavage divisions [16]. However, further experiments are required to assess the role, if any, of 5-HT in mouse oocyte meiotic maturation, as well as in other early developmental processes. To do so, it would be required to further characterize the coordinated activity of all the serotonergic components reported here in the in vivo context. The rapidly expanding panel of genetically modified mice might prove useful to assess the potential roles, in reproductive tissues, of the various serotonergic components uncovered by our work.

Interestingly, besides 5-HT, other locally-regulated biogenic amines could be involved in these same processes, since it was demonstrated that a dopamine transporter and the enzyme dopamine hydroxylase, both present in monkey oocytes, were respectively responsible for dopamine uptake and its subsequent conversion to norepinephrine, within oocytes, for later stimulation of β -adrenergic receptors of surrounding granulosa cells [46]. In conclusion, our present work confirms the existence of a local serotonergic network in mammalian COCs and, thus, provides a stronger basis for extending earlier observations of the effects of 5-HT on early processes such as follicular growth and steroidogenesis and possibly other early developmental events.

Acknowledgments

We thank B.G. Allen and the Institut de cardiologie de Montréal for providing access to their confocal microscope, and L.R. Villeneuve for technical assistance with it. M. Sainte-Marie is acknowledged for help with collecting oocytes and embryos. Thanks are also due to W. Eckberg, F. Pothier, P. Ribeiro and R. Sullivan for critical reading of early versions of this manuscript. The editorial work of O.M. Da Silva is appreciated.

References

1. Hirai S, Kishimoto T, Kadam AL, Kanatani H, and Koide SS. Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. *J Exp Zool* 1988; 245:318-321.
2. Colas P, Dubé F. Meiotic maturation in mollusc oocytes. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9:539-548.
3. Stricker SA, Smythe TL. 5-HT causes an increase in cAMP that stimulates, rather than inhibits, oocyte maturation in marine nemertean worms. *Development* 2001; 128:1415-1427.
4. Amenta F, Vega JA, Ricci A, and Collier WL. Localization of 5-hydroxytryptamine-like immunoreactive cells and nerve fibers in the rat female reproductive system. *Anat Rec* 1992; 233:478-484.
5. Bodis J, Bogнар Z, Hartmann G, Torok A, and Csaba IF. Measurement of noradrenaline, dopamine and serotonin contents in follicular fluid of human graafian follicles after superovulation treatment. *Gynecol Obstet Invest* 1992; 33:165-167.
6. Koppan M, Bodis J, Verzar, Z, Tinneberg HR, and Torok A. Serotonin may alter the pattern of gonadotropin-induced progesterone release of human granulosa cells in superfusion system. *Endocrine* 2004; 24:155-159.
7. Tanaka E, Nobuyuki B, Toshida K, and Suzuki K. Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT₂ receptor. *Life Sci* 1993; 53:563-570.

8. Terranova PF, Uilenbroek TJ, Saville L, Horst D, and Nakamura Y. Serotonin enhances oestradiol production by hamster preovulatory follicles in vitro: effects of experimentally induced atresia. *J Endocrinol* 1990; 125:433-438.
9. Graveleau C, Paust HJ, Schmidt-Grimminger D, and Mukhopadhyay AK. Presence of a 5-HT₇ receptor positively coupled to adenylate cyclase activation in human granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:1277-1286.
10. Miyazaki S, Katayama Y, and Swann K. Synergistic activation by serotonin and GTP analogue and inhibition by phorbol ester of cyclic Ca²⁺ rises in hamster eggs. *J Physiol (London)* 1990; 426:209-277.
11. Fujiwara T, Nakada K, Shirakawa H, and Miyazaki S. Development of inositol trisphosphate-induced calcium release mechanism during maturation of hamster oocytes. *Dev Biol* 1993; 156:69-79.
12. Vesela J, Rehak P, Mihalik J, Czikkova S, Pokorny J, and Koppel J. Expression of serotonin receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Physiol Rev* 2003; 52:223-228.
13. Buznikov GA, Shmukler YB, and Lauder JM. From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development. *Cell Mol Neurobiol* 1996; 16:537-559.
14. Buznikov GA, Lambert HW, and Lauder JM. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell Tissue Res* 2001; 305:177-186.
15. Sheng Y, Wang L, Liu XS, Montplaisir V, Tiberi M, Baltz JM, and Liu XJ. A serotonin receptor antagonist induces oocyte maturation in both frogs and mice:

evidence that the same G protein-coupled receptor is responsible for maintaining meiosis arrest in both species. *J Cell Physiol* 2005;202:777-86.

16. Ill'kova G, Rehak P, Vesela J, Cikos S, Fabian D, Czikkova S, and Koppel J. Serotonin localization and its functional significance during mouse preimplantation embryo development. *Zygote* 2004; 12:205-213.
17. Fitzpatrick PF. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:355-381.
18. Walther DJ, Peter J U, Bashammakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, and Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 2003; 299:76.
19. Boularand S, Darmon MC, Ganem Y, Launay J-M, and Mallet J. Complete coding sequence of human tryptophan hydroxylase. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:4257.
20. Darmon MC, Guibert B, Leviel V, Ehret M, Maitre M, and Mallet J. Sequence of two mRNAs encoding active rat tryptophan hydroxylase. *J Neurochem* 1988; 51:312-316.
21. Stoll J, Kozak CA, and Goldman D. Characterization and chromosomal mapping of a cDNA encoding tryptophan hydroxylase from a mouse mastocytoma cell line. *Genomics* 1990; 7:88-96.
22. Matsuda M, Imaoka T, Vomachka AJ, Gudelsky GA, Hou Z, Mistry M, Bailey JP, Nieport KM, Walther DJ, Bader M, and Horseman ND. Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. *Dev Cell* 2004; 6:193-203.

23. Blakely RD, Ramamoorthy S, Schroeter S, Qian Y, Apparsundaram S, Galli A, and DeFelice LJ. Regulated phosphorylation and trafficking of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins. *Biol Psychiatry* 1998; 44:169-178.
24. Chen JJ, Li Z, Pan H, Murphy DL, Tamir H, Koepsell H, and Gershon MD. Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: Abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters. *J Neurosci* 2001; 21:6348-6361.
25. Hranilovic D, Lesch K-P, Ugarkovic D, Čičin-Šain L, and Jernej B. Identification of serotonin transporter mRNA in rat platelets. *J Neural Transm* 1996; 103:957-965.
26. Faraj BA, Olkowski ZL, and Jackson RT. Expression of a high-affinity serotonin transporter in human lymphocytes. *Int J Immunopharmacol* 1994; 16:561-567.
27. Yavarone MS, Shuey DL, Sadler TW, and Lauder JM. Serotonin uptake in the ectoplacental cone and placenta of the mouse. *Placenta* 1993; 14:149-161.
28. Walther DJ, Peter JU, Winter S, Holtje M, Paulmann N, Grohmann M, Vowinckel J, Alamo-Bethencourt V, Wilhelm CS, Ahnert-Hilger G, and Bader M. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet α -granule release. *Cell* 2003; 115:851-862.
29. Vaswani M, Linda FK, and Ramesh S. Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27:85-102.
30. Hiemke C, Hartter S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther* 2000; 85:11-28.

31. Côté F, Thévenot E, Fligny C, Fromes Y, Darmon M, Ripoché MA, Bayard E, Hanoun N, Saurini F, Lechat P, Dandolo L, Hamon M, Mallet J, and Vojdani G. Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:13525-13530.
32. Walther DJ, and Bader M. Serotonin synthesis in murine embryonic stem cells. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;68:55-63.
33. Bethea CL, Pecins-Thompson M, Schutzer WE, Gundlach C, and Lu ZN. Ovarian steroids and serotonin neural function. *Mol Neurobiol* 1999; 18:87-123.
34. Sirotkin AV. Serotonin influences hormone and cyclic nucleotide release by granulosa cells isolated from porcine ovaries. *Biog Amines* 1995; 11:137-146.
35. Clausell DE, Soliman KFA. Ovarian serotonin content in relation to ovulation. *Experientia* 1978; 34:410-411.
36. Cornéa-Hébert V, Watkins KC, Roth BL, Kroeze WK, Gaudreau P, Leclerc N, and Descarries L. Similar ultrastructural distribution of the 5-HT(2A) serotonin receptor and microtubule-associated protein MAP1A in cortical dendrites of adult rat. *Neuroscience* 2002;113:23-35.
37. Muneoka KT, and Takigawa M. 5-Hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor immunoreactivity-positive 'stigmoid body'-like structure in developing rat brains. *Int J Dev Neurosci* 2003;21:133-143.
38. Shuey DL, Sadler TW, Tamir H, and Lauder JM. Serotonin and morphogenesis. Transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse. *Anat Embryol* 1993; 187:75-85.

39. Yavarone MS, Shuey DL, Tamir H, Sadler TW, and Lauder JM. Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. *Teratology* 1993; 47:573-584.
40. Cerdà J, Petrino TR, Greenberg MJ, and Wallace RA. Pharmacology of the serotonergic inhibition of steroid-induced reinitiation of oocyte meiosis in the teleost *Fundulus heteroclitus*. *Mol Reprod Dev* 1997; 48:282-291.
41. Cerdà J, Reich G, Wallace RA, and Selman K. Serotonin inhibition of steroid-induced meiotic maturation in the teleost *Fundulus heteroclitus*: role of cyclic AMP and protein kinases. *Mol Reprod Dev* 1998; 49:333-341.
42. Eppig JJ. Regulation of mammalian oocyte maturation. In: Adashi EY, Leung PCK, (eds.), *The Ovary*. New York: Raven Press; 1993: 185-208.
43. Mehlmann LM, Jones TLZ, and Jaffe LA. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science* 2002; 297:1343-1345.
44. Kalinowski RR, Berlot CH, Jones TLZ, Ross LF, Jaffe LA, and Mehlmann LM. Maintenance of meiotic prophase arrest in vertebrate oocytes by a Gs protein-mediated pathway. *Dev Biol* 2004; 267:1-13.
45. Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, Brennan TJ, Evsikov AV, Pendola FL, Knowles BB, Eppig JJ, and Jaffe LA. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science* 2004; 306:1947-1950.
46. Mayerhofer A, Smith GD, Danilchik M, Levine JE, Wolf DP, Dissen GA, and Ojeda SR. Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: evidence for a cell-cell regulatory loop. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:10990-10995.

Figures

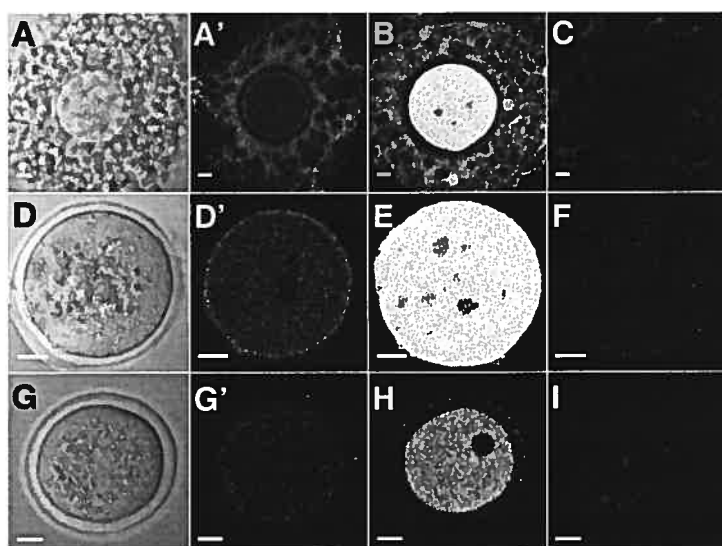


Figure 1. 5-HT in mouse COCs, and oocytes. Indirect immunofluorescence confocal microscopy (1 μm middle optical section), using an anti-5-HT antibody, of a COC (A, A' and B), an isolated MII oocyte (D, D' and E) and a GV-stage oocyte (G, G' and H). Panels A, B and G show phase contrast images of the same cells seen in immunofluorescence in panels A', B' and G'. Similarly-prepared COC and oocytes that had been previously incubated with 500 nM 5-HT for 20 min reveal enhanced 5-HT-specific fluorescence (B, E and H). Panels C, F and I show, respectively, a COC, an isolated MII oocyte and a GV-stage oocyte prepared using an anti-5-HT antibody previously depleted by pre-incubation with a BSA-5-HT complex. Scale bars, 10 μm .

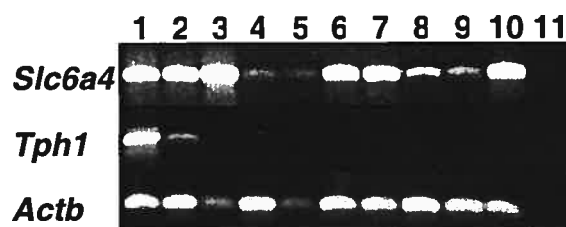


Figure 2. Expressions of 5-HT transporter and tryptophan hydroxylase mRNAs in cumulus cells, oocytes and embryos. RT-PCR-amplified bands for *Slc6a4*, *Tph1* and *Actb* control obtained with mRNA extracted respectively from (lanes 1 to 11) total ovaries (1), isolated cumulus cells (2), GV-stage (3), MII oocytes (4), 1-cell (5), 2-cell (6), 4-cell (7) and 8-cell embryos (8), morulas (9), blastocysts (10) and a representative negative control sample without cDNA (11).

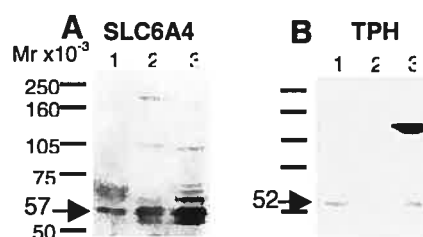


Figure 3. Expressions of 5-HT transporter and tryptophan hydroxylase proteins in cumulus cells and MII oocytes. (A) Western blotting using an anti-SLC6A4 antibody against samples from brain (1), isolated oocytes (2) and cumulus cells (3) showing a common major band at an apparent molecular weight of 57 kDa. (B) Western blotting using an anti-TPH antibody against samples as in (A), displaying a common major band (52 kDa) in brain (1) and cumulus cells (3) but not in isolated oocytes (2). An additional band (127 kDa) of unknown nature is also detected in cumulus cells (3). Similar results were obtained in three separate experiments.

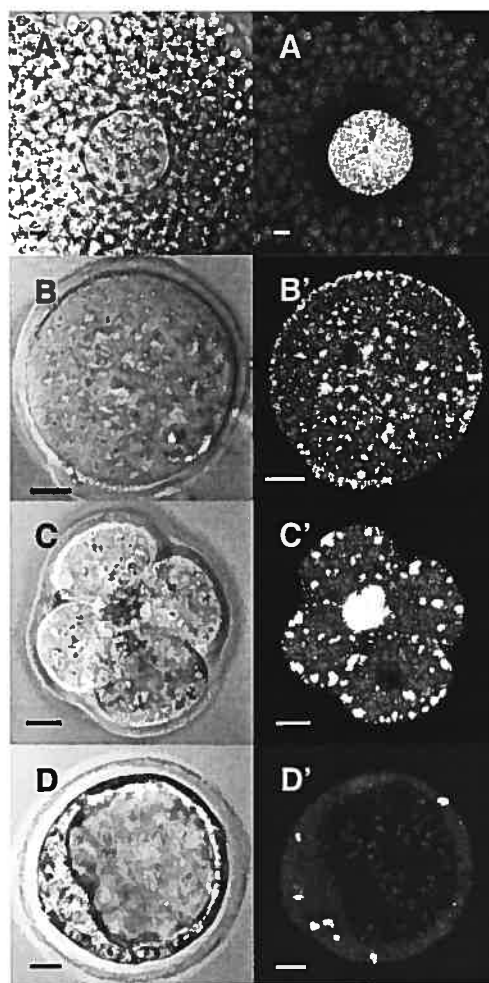


Figure 4. Expression of 5-HT transporter protein in COCs, isolated MII oocytes and early embryos. Immunofluorescence of cells prepared with an anti-SLC6A4 antibody and observed by confocal microscopy. Phase contrast (A-D) and corresponding fluorescence (A'-D') images of a mouse COC (A-A'), isolated MII oocyte (B-B'), a 4-cell stage embryo (C-C'), and a 4-day-old blastocyst (D-D'). Scale bars, 10 μ m.

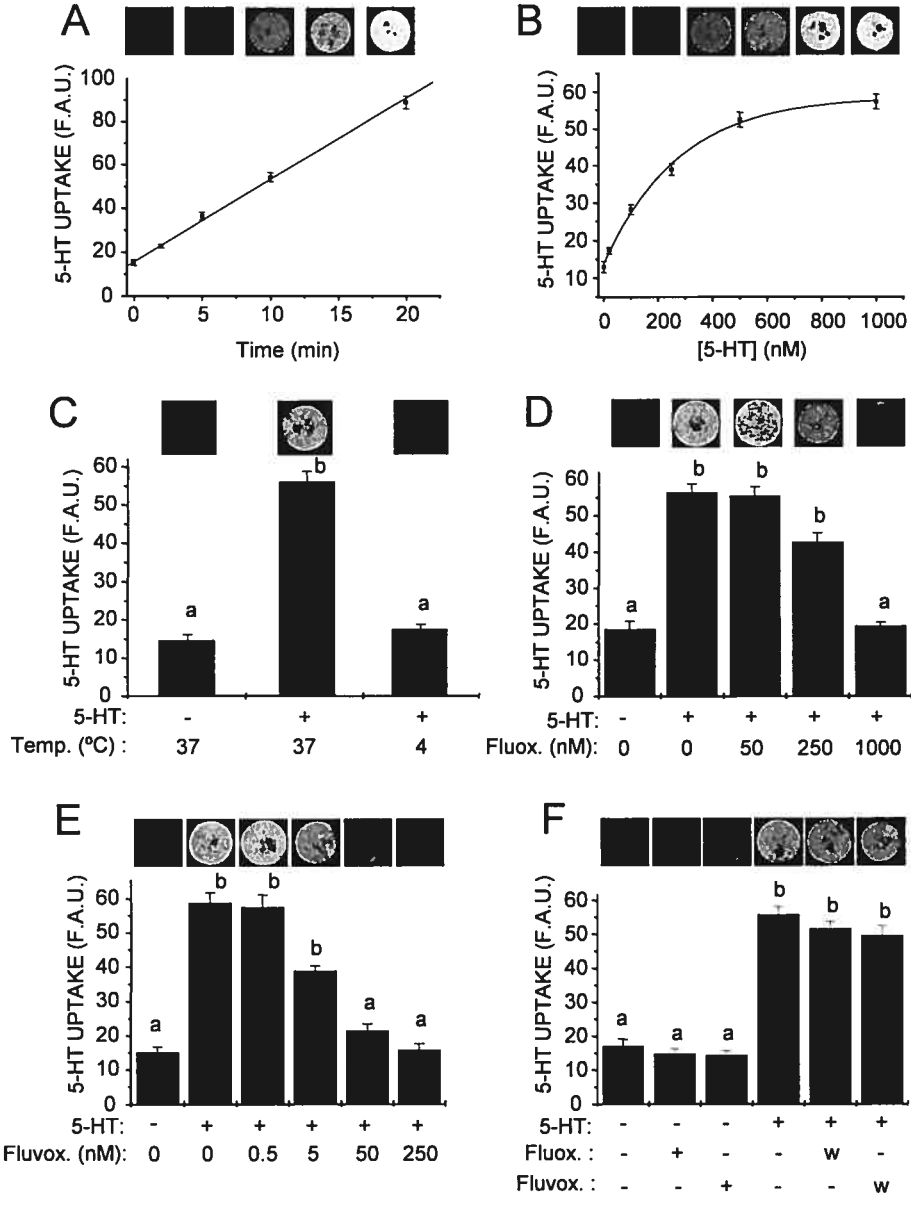


Figure 5. 5-HT transport in mouse MII oocytes. (A) 5-HT uptake over time as measured by the fluorescence intensity (F.A.U., fluorescence arbitrary units) of oocytes prepared with an anti-5-HT antibody. Mean fluorescence intensities of 30-50 oocytes (+ S.E.M.). The upper panels show a typical oocyte prepared as in Figure 1 and seen by immunofluorescence microscopy for the corresponding time points. (B) 5-HT uptake at different external concentrations (0 to 1000 nM) over a 10-min incubation period. (C) 5-HT uptake inhibition at low temperature (4°C). (D) Effects of fluoxetine and (E) fluvoxamine on 5-HT transport by oocytes with 10-min incubation in the presence of the indicated drug concentrations (0-1000 nM). (F) Lack of effects of 1 μ M fluoxetine or fluvoxamine added alone on basal 5-HT levels, and reversibility of their effects on the transport of added 5-HT after washing of cells (w). Letters a and b indicate means that are significantly different or not from one another ($P < 0.05$).

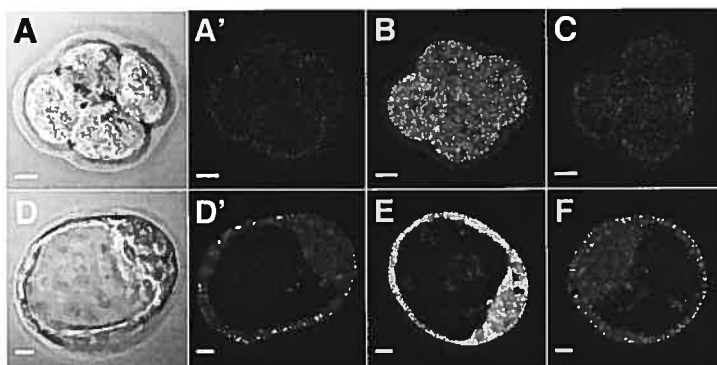


Figure 6. 5-HT in mouse embryos. Indirect immunofluorescence confocal microscopy (1 μm middle optical section), using an anti-5-HT antibody, of a 4-cell stage embryo (A,A', B,C) and a blastocyst (D,D',E,F). The same untreated 4-cell embryo(A,A') or blastocyst (D,D') are seen in phase contrast with their corresponding immunofluorescence image. Similarly-prepared embryos that had been previously incubated with 500 nM 5-HT for 20 min reveal enhanced 5-HT-specific fluorescence (B,E) that can be inhibited by a 15 min pre-incubation in 1 μM fluvoxamine (C,F). Scale bars, 10 μm .

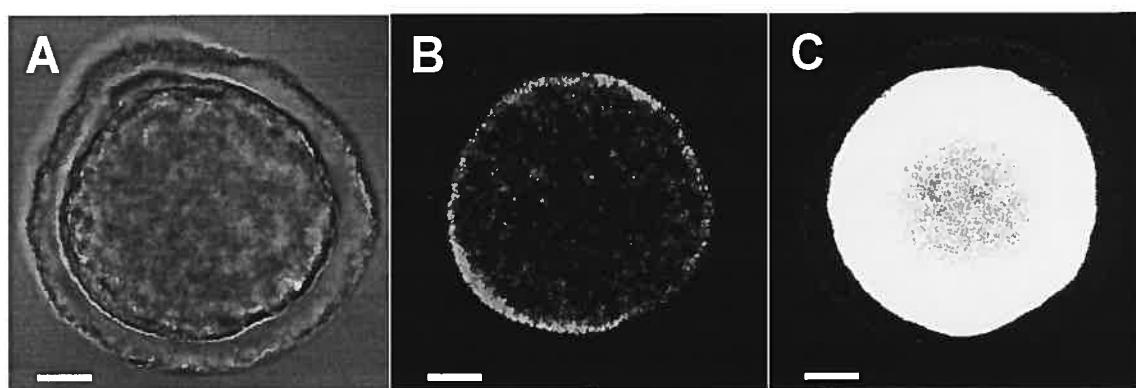


Figure 7. Presence of serotonin in hamster oocytes. Immunofluorescence of isolated MII hamster oocytes prepared with an anti-5-HT antibody, as described, and examined by confocal microscopy. (A) and (B) Same hamster oocyte seen in phase contrast (A) and in fluorescence (B) without any further treatment. (C) Hamster oocyte similarly prepared after incubation in the presence of 5-HT added externally at 500 nM for 20 min. Scale bars, 10 μ M.

Chapitre 5 :
Résultats complémentaires
Clonage et séquençage des ADNc des récepteurs
5-HT_{2A} et 5-HT₇ de hamster doré et leur expression
dans les ovocytes et les cellules du cumulus

5.1 Mise en situation

L'information disponible au début du projet sur la 5-HT et l'expression de ses récepteurs dans les ovocytes de mammifères provenait d'études réalisées chez le hamster doré. Ces articles rapportaient des oscillations calciques, sensibles à des antagonistes de récepteurs 5-HT_{2A}, dans les ovocytes de hamster lorsque ceux-ci étaient exposés à la 5-HT (Miyazaki *et al.*, 1990; Fujiwara *et al.*, 1993; Shiraishi *et al.*, 1995). Étant donné l'absence du récepteur 5-HT_{2A} et d'effet de la 5-HT sur le niveau calcique des ovocytes de souris, il importait de vérifier s'il existait une différence dans l'expression des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT₇, entre les deux espèces. Toutefois, les séquences de ces deux récepteurs n'étant pas connues chez le hamster doré, il était nécessaire de procéder à leur séquençage afin de pouvoir en mesurer l'expression par RT-PCR.

5.2 Matériel et méthodes

Récolte des ovocytes et cellules du cumulus de hamster

Les ovocytes et cellules du cumulus ont été récoltées en superovulant des hamsters dorés femelles, tel que décrit dans la partie "Matériel et méthodes" de la section 4.3 de cette thèse, sauf que la zone pellucide des ovocytes a été enlevée par une courte incubation dans une solution de Tyrode acide (Sigma) et les ovocytes congelés immédiatement après leur récolte par immersion dans l'azote liquide.

Isolation d'ARNm et RT-PCR pour l'obtention des séquences complètes des récepteurs 5-HT₇ et 5-HT_{2A} chez le hamster

L'isolation de l'ARN total du cerveau de hamster et la reverse transcription ont été effectuées selon le protocole décrit dans la partie "Matériel et méthodes" de la section 4.1. Pour chaque PCR, 1/10 de RT a été utilisé en 1^{er} PCR. Le programme PCR, de 30 cycles avec un "hot start", consistait en une étape de dénaturation de 60 sec à 94°C, une étape d'appariement de 60 sec à 65°C et une étape de synthèse de 60 sec à 72°C (dernière synthèse de 15 min). La 2^{ème} amplification a été effectuée à l'aide du même programme PCR, mais en utilisant 1/20 de 1 µl de 1^{er} PCR comme matériel de départ.

Pour le récepteur 5-HT₇, sept clones ont été obtenus en utilisant le programme décrit plus haut et les oligonucléotides décrits dans le tableau 5.1 (page 186). Le clone 5-HT₇-1 a été obtenu à l'aide d'une amplification nichée, le clone 5-HT₇-2 à partir d'une amplification PCR simple et les clones 5-HT₇-3, 4, 5, 6 et 7 à partir d'amplifications semi-nichées.

AMORCE	ORIENTATION	PCR	CLONE OBTENU	SÉQUENCE 5'-3'
U7F1	Sens	1 ^{er}	1, 6, 7	atgcccatggacgtcatgtgtgcac
U7F2	Sens	1 ^{er}	2	atgtgctgcacggcctcgatcatgac
U7F2	Sens	2 ^{ième}	1, 6, 7	atgtgctgcacggcctcgatcatgac
5HT7HA5'1	Sens	1 ^{er} et 2 ^{ième}	3, 4, 5	gagcgggcaaggtgaatcca
U7R1	Anti-sens	1 ^{er}	1, 3, 4, 5	aaagggttaatgagagagttgcatagcc
U7R2	Anti-sens	2 ^{ième}	1, 3, 4, 5	gagagagttgcatagcccagccacag
5HT7HA3'1	Anti-sens	1 ^{er} et 2 ^{ième}	6, 7	tgccaagaagacagaagccatgttccat
5HT7HA3'	Anti-sens	1 ^{er}	2	ttgcactattccacctccggcattccac

Tableau 5.1 Oligonucléotides utilisés pour l'obtention de la séquence complète du récepteur 5-HT₇ de hamster doré.

Pour le récepteur 5-HT_{2A}, 4 clones ont été obtenus à l'aide des oligonucléotides décrits dans le tableau 5.2 (page 187) et en utilisant le programme PCR décrit plus haut. Les clones 5-HT_{2A}-1 et 4 ont été obtenus à partir d'amplifications nichées et les clones 5-HT_{2A}-2 et 3 à partir d'amplifications semi-nichées.

AMORCE	ORIENTATION	PCR	CLONE OBTENU	SÉQUENCE 5'-3'
5HT2AHA5'1	Sens	1 ^{er} et 2 ^{ième}	1, 4	tcacacttctgtaactcttactatgg
5HT2AS2	Sens	1 ^{er}	2, 3	accatagccgcttcaactccagaacc
5HT2AS6	Sens	2 ^{ième}	2, 3	taaccatcatgggatcacctacttcct
5HT2AS4	Anti-sens	1 ^{er}	1, 4	caatccagacaaacacattgagcagggc
5HT2AS7	Anti-sens	2 ^{ième}	1, 4	tggtgatgaagaatgggcaccacattac
5HT2AHA3'1	Anti-sens	1 ^{er}	2, 3	ggctaaaaactggttcaagtgcatt
5HT2AHA3'2	Anti-sens	2 ^{ième}	2, 3	actggttcaagtgcattgtcatagcaa

Tableau 5.2 Oligonucléotides utilisés pour l'obtention de la séquence complète du récepteur 5-HT_{2A} de hamster doré.

Clonage et séquençage

Tous les produits PCR obtenus ont été clonés dans le plasmide pCRII selon les recommandations du manufacturier (Invitrogen). Les produits clonés ont ensuite été séquencés par le laboratoire de séquençage du CHUM. Chaque clone a été séquencé sur les deux brins.

Isolation d'ARNm et RT-PCR pour vérifier l'expression des récepteurs 5-HT₇ et 5-HT_{2A} chez le hamster

L'isolation de l'ARNm et la reverse transcription à partir d'ovocytes et de cellules du cumulus de hamster ont été effectuées selon le protocole décrit dans la partie "Matériel

et méthodes” de la section 4.3 de cette thèse. Pour chaque PCR, l'équivalent de 10 ovocytes ou les cellules du cumulus de 30-50 COCs ont été utilisés et le 1^{er} PCR effectué directement sur les billes d'ADNc en suspension. Le programme PCR, de 30 cycles avec un “hot start”, consistait en une étape de dénaturation de 60 sec à 94°C, une étape d'appariement de 60 sec à 62°C et une étape de synthèse de 60 sec à 72°C (dernière synthèse de 15 min). La 2^{ème} amplification a été effectuée à l'aide du même programme PCR, mais en utilisant 1/20 de 1 µl de 1^{er} PCR comme matériel de départ. Pour le récepteur 5-HT₇, la 1^{ère} paire d'oligonucléotides était U7F1 et U7R1 et la 2^{ème} paire était U7F2 et U7R2 (tableau 5.1, page 186), produisant un fragment attendu de 642 pb. Pour le récepteur 5-HT_{2A}, la 1^{ère} paire d'oligonucléotides était 5HT2AS2 et 5HT2AS4 et la 2^{ème} paire 5HT2AS6 et 5HT2AS7 (tableau 5.2, page 187), produisant un fragment attendu de 288 pb. Un tiers de la seconde réaction d'amplification a été chargée sur un gel d'agarose 1.5% et les bandes ont été visualisées au bromure d'éthidium. Chaque amplification a été effectuée au moins trois fois et des résultats reproductibles ont été obtenus.

5.3 Résultats

Le premier objectif était d'obtenir la séquence codante complète du récepteur 5-HT₇ de hamster doré. Pour ce faire, des oligonucléotides ont été conçus en ciblant des régions conservées des séquences du récepteur 5-HT₇ de souris, de rat, de Xénope et d'humain. La 1^{ère} amplification, à partir d'ADNc de cerveau, a produit un fragment de 645 pb (5-HT₇-1) de séquence codante possédant une très forte homologie avec les séquences des autres espèces. Étant donné la forte homologie du fragment séquencé avec les autres espèces et la présence, dans les banques de données, de séquences 5' et 3' non-traduites d'autres espèces et très semblables entre elles, des oligonucléotides spécifiques pour les régions bordant la séquence codante ont été conçus et des amplifications directes ont été effectuées sans utiliser les méthodes plus conventionnelles de 5' ou 3' RACE. Cette stratégie a permis d'obtenir des clones (5-HT₇-2, 884 pb; 5-HT₇-6 et 7, 931 pb) de la fin de la séquence codante et du début de la

région 3' non-traduite (Figure 5.1, page 190). De la même façon, une partie de la région 5' non traduite et le début de la séquence codante ont été obtenus en séquençant trois clones (5-HT₇-3, 4 et 5, 1230 pb) provenant d'amplifications différentes (Figure 5.1, page 190).

La séquence complète du récepteur 5-HT₇ (GenBank, DQ015679) de hamster est montrée en figure 5.2 (page 191) et son analyse a permis de déterminer que la région codante, de 1347 pb, débute au nucléotide 88. La séquence déduite code pour une protéine de 448 acides aminés avec une masse moléculaire prédite de 49.79 kDa. La comparaison de la séquence en acides aminés du récepteur 5-HT₇ de hamster doré avec d'autres séquences connues montre qu'elle est identique à 98% (439/448) avec le récepteur 5-HT₇ de rat (Genbank, P32305), à 97% (433/448) avec le récepteur 5-HT₇ de souris (P32304) et à 94% (422/448) avec le récepteur 5-HT₇ humain (CAH69967). La figure 5.3 (page 193) compare la séquence du récepteur 5-HT₇ de hamster doré avec celles de rat, de souris et d'humain. La quasi-totalité des différences entre la séquence de hamster doré et celles de rat (7/9), de souris (11/15) et d'humain (21/23) se trouve à l'extérieur des passages transmembranaires présumés, qui sont les régions les mieux conservées des RCPG. La forte similarité entre ces séquences établit clairement que cette protéine est l'homologue du récepteur 5-HT₇ chez le hamster doré.

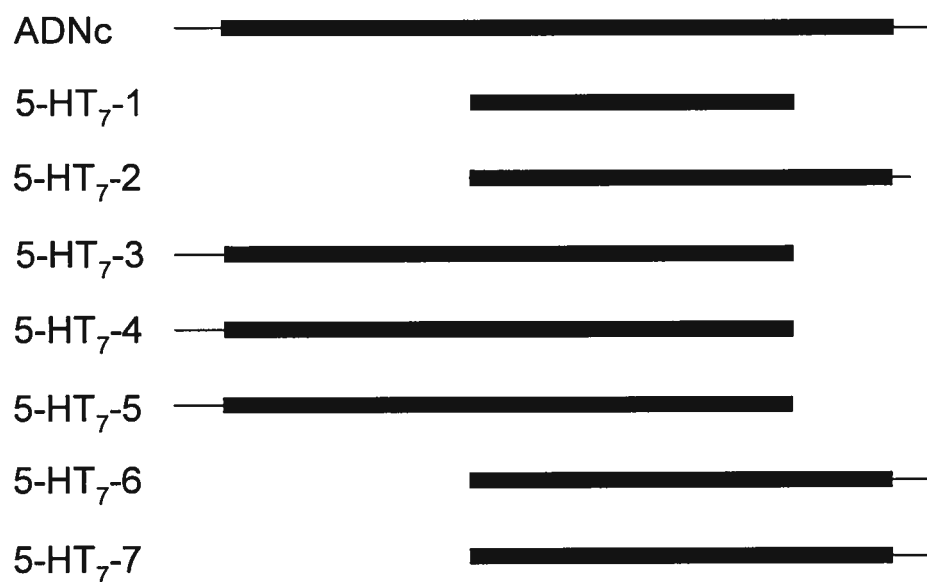


Figure 5.1 Représentation des différents clones de récepteur 5-HT₇ de hamster doré séquencés. Ces clones ont été obtenus par RT-PCR en utilisant de l'ADNc de cerveau à l'aide d'oligonucléotides dirigés contre des régions conservées des ADNc de souris, de rat de Xénope et d'humain. Ces clones ont été séquencés sur les deux brins. La région codante de l'ADNc est représentée par une large ligne.

1 GAGCGGGCAAGGTGAATCCAGCCCCGGGGCCCGCAGCCGAGCGCTCTGCTGGGGCGCCGGCTCCATGGGCAGCGCGCTCGG
 84 CACG

 88 M M D V N S S G R P D L Y G H L R S L I L
 ATG ATG GAC GTT AAC AGC AGC GGC CGT CCC GAC CTC TAC GGC CAC CTC CGC TCG CTC ATC CTG
 151 P E V G H G L Q D L S P D G G A H S V V S
 CCG GAG GTG GGG CAC GGG CTG CAA GAT CTG AGC CCC GAC GGT GGC GCC CAC TCG GTG GTG AGC
 214 S W M P H L L S G V P E V T A S P A P T W
 TCC TGG ATG CCG CAC CTG CTG AGC GGC GTC CCG GAG GTG ACG GCT AGC CCC GCG CCC ACC TGG
 277 D A P P D N V S G C G E Q I N Y G R V E K
 GAC GCG CCC CCG GAC AAT GTC TCC GGC TGC GGG GAG CAG ATC AAC TAC GGC AGA GTC GAG AAA
 340 V V I G S I L T L I T L L T I A G N C L V
 GTT GTG ATC GGC TCC ATC CTG ACG CTC ATC ACG CTG CTG ACG ATC GCA GGC AAC TGC CTG GTG
 403 V V S V C F V K K L R Q P S N Y L I V S L
 GTG GTC TCG GTG TGC TTC GTC AAG AAG CTC CGC CAG CCC TCC AAC TAC TTG ATT GTG TCC CTG
 466 A L A D L S V A V A V M P F V S V T D L I
 GCG CTG GCT GAC CTC TCG GTG GCC GTG GCG GTC ATG CCT TTC GTT AGC GTC ACA GAC CTC ATC
 529 G G K W I F G H F F C N V F I A M D V M C
 GGG GGC AAG TGG ATC TTT GGC CAC TTC TTC TGC AAC GTT TTC ATC GCC ATG GAC GTC ATG TGC
 592 C T A S I M T L C V I S I D R Y L G I T R
 TGC ACG GCC TCG ATC ATG ACC CTG TGC GTG ATC AGC ATC GAC AGG TAC CTT GGG ATC ACG AGA
 655 P L T Y P V R Q N G R C M A K M I L S V W
 CCC CTC ACA TAC CCT GTG AGG CAG AAT GGG AGG TGC ATG GCC AAA ATG ATT CTG TCG GTC TGG
 718 L L S A S I T L P P L F G W A Q N V N D D
 CTT CTC TCG GCC TCC ATC ACC TTA CCT CCG CTC TTC GGA TGG GCT CAG AAT GTA AAC GAT GAC
 781 K V C L I S Q D F G Y T I Y S T A V A F Y
 AAA GTG TGC TTG ATC AGC CAG GAT TTT GGC TAC ACG ATC TAC TCC ACC GCC GTG GCG TTT TAT
 844 I P M S V M L F M Y Y Q I Y K A A R K S A
 ATC CCC ATG TCG GTC ATG CTG TTC ATG TAC TAT CAG ATT TAC AAG GCC GCC AGG AAG AGC GCG
 907 A K H K F P G F P R V Q P E S V I S L N G
 GCC AAA CAC AAG TTC CCA GGC TTC CCG CGC GTG CAG CCG GAG AGC GTC ATC TCT CTG AAC GGC
 970 V V K L Q K E V E E C A N L S R L L K H E
 GTG GTG AAG CTC CAG AAG GAG GTG GAG GAA TGC GCA AAC CTT TCG AGA CTG CTC AAA CAC GAA
 1033 R K N I S I F K R E Q K A A T T L G I I V
 AGG AAA AAC ATC TCC ATC TTC AAG AGG GAA CAG AAA GCA GCC ACC ACG TTG GGG ATC ATC GTG
 1096 G A F T V C W L P F F L L S T A R P F I C
 GGA GCC TTC ACA GTG TGC TGG CTG CCG TTT TTC CTC TTG TCC ACA GCA AGA CCC TTT ATC TGT
 1159 G T A C S C I P L W V E R T C L W L G Y A
 GGC ACG GCC TGC AGC TGC ATC CCG CTG TGG GTG GAG AGG ACA TGT CTG TGG CTG GGC TAT GCA
 1222 N S L I N P F I Y A F F N R D L R T T Y R
 AAC TCT CTC ATT AAC CCT TTT ATA TAT GCC TTC TTC AAC CGG GAC CTG AGG ACC ACC TAC CGC
 1285 S L L Q C Q Y R N I N R K L S A A G M H E
 AGC CTA CTC CAG TGC CAG TAC AGG AAT ATC AAT CGG AAG CTC TCT GCA GCA GGC ATG CAC GAG
 1348 A L K L A E R P E R V E F V L Q N S D H C
 GCC CTG AAA CTT GCT GAG AGG CCT GAG AGA GTC GAG TTT GTG CTA CAA AAC TCT GAC CAC TGT
 1411 S K K G H D T *
 AGC AAA AAA GGT CAC GAT ACA TGA
 1435 TCCAGAGTGAATGCCGAGGTGAATAGTGCAAAACAGATGGAAACAACGAAACCATTGGCTGAGACTTCAAAATGGAACA

Figure 5.2 Séquence en nucléotides et en acides aminés déduite du récepteur 5-HT₇ de hamster doré. Les 1516 pb de la séquence comprennent 87 pb de région 5' non traduite, 1347 de séquence codante et 82 pb de région 3' non traduite. L'ORF débute au nucléotide 88 et code une protéine de 448 acides aminés. (GenBank, DQ015679)

Figure 5.3 Comparaison de la séquence en acides aminés déduite du récepteur 5-HT₇ de hamster doré avec les récepteurs 5-HT₇ de rat, de souris et d'humain. La séquence de hamster doré est identique à 98% avec la protéine de rat, à 97% avec la protéine de souris et à 94% avec la protéine humaine. Les acides aminés en rouge représentent des acides aminés fortement conservés, ceux en bleu sont faiblement conservés et ceux en noir ne sont pas conservés. Les sept passages transmembranaires présumés sont représentés par des lignes noires au-dessus de la séquence.

Le 2^{ème} objectif était d'obtenir la séquence codante complète du récepteur 5-HT_{2A} de hamster doré. Pour ce faire, une technique fort semblable à celle utilisée pour l'obtention du récepteur 5-HT₇ a été utilisée. En étudiant, dans les banques de données, les séquences du récepteur 5-HT_{2A} de hamster chinois, de souris, de rat et d'humain et compte tenu de la forte homologie de ces séquences dans la région codante et dans les régions 5' et 3' non-traduites, des oligonucléotides spécifiques permettant l'amplification de la totalité de la région codante ont été conçus. Cette méthode a permis d'obtenir deux clones (5-HT_{2A}-1 et 4, 712 pb) de la fin de la séquence codante et du début de la région 3' non-traduite (Figure 5.4, page 196). Deux clones comportant une partie de la région 5' non traduite et le début de la séquence codante (5-HT_{2A}-2 et 3, 1123 pb) ont aussi été obtenus (Figure 5.4, page 196).

La séquence complète du récepteur 5-HT_{2A} de hamster (GenBank, DQ015678) est montrée en figure 5.5 (page 197) et son étude a permis de déterminer que la région codante, de 1413 pb, débute au nucléotide 98. La séquence déduite code pour une protéine de 471 acides aminés avec une masse moléculaire de 52.73 kDa. La comparaison de la séquence en acides aminés du récepteur 5-HT_{2A} de hamster doré avec d'autres séquences connues montre qu'elle est identique à 96% (452/471) avec le récepteur 5-HT_{2A} de hamster chinois (Genbank, P18599), à 94% (445/471) avec les récepteurs 5-HT_{2A} de rat et de souris (NP058950 et NP766400) et à 91% (427/471) avec le récepteur 5-HT_{2A} humain (CAI16877). La figure 5.6 (page 199) compare la séquence du récepteur 5-HT_{2A} de hamster doré avec celles de hamster chinois, de rat, de souris et d'humain. Encore une fois, une grande majorité des différences se trouve à l'extérieur des passages transmembranaires présumés et la plupart des acides aminés non conservés se trouvent dans les régions N- et C-terminales de la séquence. La forte similarité entre ces séquences établit clairement que cette protéine est l'homologue du récepteur 5-HT_{2A} chez le hamster doré.

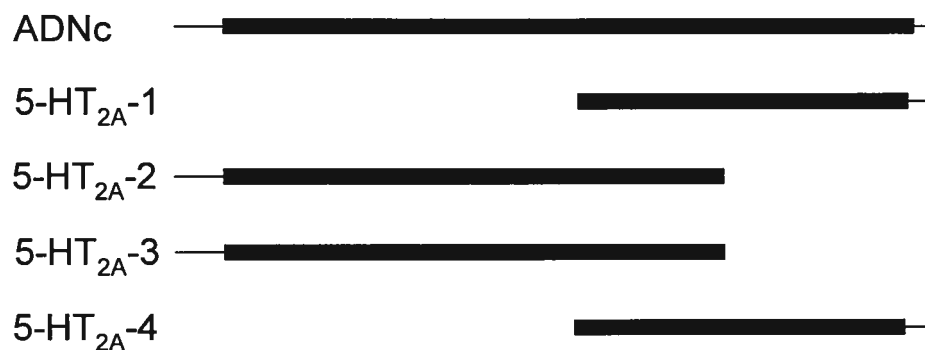


Figure 5.4 Représentation des différents clones de récepteur 5-HT_{2A} de hamster doré séquencés. Ces clones ont été obtenus par RT-PCR en utilisant de l'ADNc de cerveau à l'aide d'oligonucléotides dirigés contre des régions conservées des ADNc de hamster chinois, de souris, de rat et d'humain. Ces clones ont été séquencés sur les 2 brins. La région codante de l'ADNc est représentée par une large ligne.

```

1  ACACGTCCTAGCACCGGGGCATGAAGATGAATGGTGAGCCAAGGCTATGACTTGCTAGTCCTTCCACACTTCATCTGCTACAA
84 CTTCCGGCTTAGAC

    M E I L C E D N T S L S S I P N S L M Q L
98 ATG GAA ATT CTT TGT GAA GAC AAT ACT TCT CTG AGC TCA ATT CCA AAC TCT TTA ATG CAA TTA

    D G D S R L Y H N D F N S R D A N S S D A
161 GAT GGT GAC TCC AGG CTC TAC CAT AAC GAC TTC AAC TCC AGA GAT GCT AAC AGC TCT GAT GCA

    S N W T I D A E N R T N L S C E G Y L P P
224 TCA AAC TGG ACA ATT GAT GCG GAA AAC CGG ACC AAT CTT TCC TGC GAA GGG TAC CTC CCA CCG

    T C L S I L H L Q E K N W S A L L T T V V
287 ACA TGC CTC TCC ATT CTT CAT CTC CAG GAA AAA AAC TGG TCT GCT TTA TTG ACA ACT GTA GTG

    I I L T I A G N I L V I M A V S L E K K L
350 ATT ATC CTA ACC ATT GCT GGA AAC ATA CTG GTC ATC ATG GCA GTG TCC CTA GAG AAA AAG CTA

    R N A T N Y F L M S L A I A D M L L G F L
413 CGG AAT GCC ACC AAC TAT TTC CTG ATG TCA CTT GCC ATA GCT GAT ATG CTG CTG GGC TTC CTT

    V M P V S M L T I L Y G Y R W P L P S K L
476 GTC ATG CCT GTG TCC ATG TTA ACC ATC TTG TAT GGG TAC CGG TGG CCT TTG CCC AGC AAG CTC

    C A V W I Y L D V L F S T A S I M H L C A
539 TGT GCA GTC TGG ATC TAC CTG GAC GTC CTC TTC TCC ACG GCC TCC ATC ATG CAC CTC TGT GCT

    I S L D R Y V A I Q N P I H H S R F N S R
602 ATT TCA CTG GAC CGC TAT GTC GCC ATC CAG AAC CCC ATC CAC CAT AGC CGC TTC AAC TCC AGA

    T K A F L K I I A V W T I S V G I S M P I
665 ACC AAG GCC TTC CTG AAA ATC ATT GCT GTG TGG ACC ATA TCC GTA GGT ATA TCC ATG CCG ATC

    P V F G L Q D D S K V F K E G S C L L A D
728 CCA GTC TTT GGA TTG CAG GAT GAC TCG AAG GTC TTT AAG GAG GGG AGC TGC CTG CTC GCC GAT

    D N F V L I G S F V A F F I P L T I M V I
791 GAC AAT TTT GTC CTC ATA GGT TCT TTT GTG GCG TTT TTC ATC CCC TTA ACC ATC ATG GTT ATC

    T Y F L T I K S L Q K E A T L C V S D L S
854 ACC TAC TTC CTC ACT ATC AAG TCA CTT CAG AAA GAA GCC ACC CTG TGC GTG AGT GAC CTC AGT

    T R A K L A S F S F L P Q S S L S S E K L
917 ACC CGG GCC AAA TTA GCC TCC TTC AGC TTC CTG CCT CAG AGC TCT CTG TCG TCC GAA AAG CTC

    F Q R S I H R E P G S Y T G R R T M Q S I
980 TTC CAG CGG TCC ATC CAC AGG GAG CCA GGC TCC TAC ACA GGC AGG AGG ACG ATG CAA TCC ATC

    S N E Q K A C K V L G I V F F L F V V M W
1043 AGC AAT GAG CAA AAA GCG TGC AAG GTG CTG GGC ATC GTG TTC TTT CTG TTT GTC GTA ATG TGG

    C P F F I T N I M A V I C K E S C N E D I
1106 TGC CCA TTC TTC ATC ACC AAC ATC ATG GCC GTC ATC TGC AAA GAG TCC TGC AAC GAA GAT ATC

    I G A L L N V F V W I G Y L S S A V N P L
1169 ATC GGA GCC CTG CTC AAT GTG TTT GTC TGG ATT GGA TAC CTC TCC TCA GCT GTC AAT CCA CTG

    V Y T L F N K T Y R S A F S R Y I Q C Q Y
1232 GTC TAT ACA CTG TTC AAC AAG ACT TAC AGG TCT GCC TTC TCG CGG TAC ATT CAG TGT CAG TAC

    K E N R K P L Q L I L V N T I P A L A Y K
1295 AAG GAA AAC AGA AAG CCA CTG CAG TTA ATT TTA GTG AAC ACT ATA CCG GCG TTG GCC TAC AAG

    S G Q L Q A G Q N K N S K E D S E P A G N
1358 TCT GGT CAG CTC CAG GCG GGA CAA AAT AAG AAC TCT AAG GAA GAT TCT GAG CCG GCA GGT AAT

    D C S M V T L G K Q Q S D E T C T D S I N
1421 GAC TGC TCT ATG GTT ACA CTA GGA AAA CAA CAG TCC GAC GAG ACT TGT ACA GAC AGT ATC AAC

    T M N E K V S C V *
1484 ACC ATG AAT GAA AAG GTT AGC TGC GTG TGA

1511 TGGACTGGTTGCTATGACAATGGCACTTGAACCAGT

```

Figure 5.5 Séquence en nucléotides et en acides aminés déduite du récepteur 5-HT_{2A} de hamster doré. Les 1546 pb de la séquence comprennent 97 pb de région 5' non traduite, 1413 de séquence codante et 36 pb de région 3' non traduite. L'ORF débute au nucléotide 98 et code une protéine de 471 acides aminés. (GenBank, DQ015678)

Figure 5.6 Comparaison de la séquence en acides aminés déduite du récepteur 5-HT_{2A} de hamster doré avec les récepteurs 5-HT_{2A} de hamster chinois, de rat, de souris et d'humain. La séquence de hamster doré est identique à 96% avec la protéine de hamster chinois, à 94% avec la protéine de rat, à 94% avec la protéine de souris et à 91% avec la protéine humaine. Les acides aminés en rouge représentent des acides aminés fortement conservés, ceux en bleu sont faiblement conservés et ceux en noir ne sont pas conservés. Les sept passages transmembranaires présumés sont représentés par des lignes noires au-dessus de la séquence.

Finalement, des oligonucléotides spécifiques ciblant la partie codante de l'ARNm du récepteur 5-HT_{2A} ont été utilisés dans une stratégie de PCR niché pour évaluer l'expression de ce récepteur dans les ovocytes ovulés et les cellules du cumulus. Une bande de taille attendue a été détectée dans les préparations d'ovocytes (Figure 5.7 A, ligne 1, page 202) et de cellules du cumulus (Figure 5.7 B, ligne 1, page 202). L'expression de l'ARNm du récepteur 5-HT_{2A} chez le hamster doré différerait donc de celle observée chez la souris, où l'expression de l'ARNm et de la protéine est restreinte aux cellules du cumulus (section 4.2 de cette thèse). Ce résultat est en accord avec l'expression rapportée de l'ARNm du récepteur 5-HT_{2A} dans les ovocytes humains (Neilson *et al.*, 2000) et avec l'observation d'oscillations calciques, sensibles à des antagonistes du récepteur 5-HT_{2A}, dans les ovocytes de hamster exposés à la 5-HT (Miyazaki *et al.*, 1990). En adoptant une stratégie de RT-PCR similaire pour l'ARNm du récepteur 5-HT₇, un produit de taille attendue a été détecté dans les préparations de cellules du cumulus (Figure 5.7 B, ligne 4, page 202), mais non dans celles d'ovocytes (Figure 5.7 A, ligne 4, page 202). L'expression de ce récepteur diffère donc aussi de celle observée chez la souris, puisque l'ARNm et la protéine du récepteur 5-HT₇ ont été détectés dans les ovocytes de souris (section 4.2 de cette thèse). Les différentes amplifications pour l'un ou l'autre des récepteurs n'ont pas produit de fragments d'autres tailles et des contrôles négatifs, effectués sans reverse transcription, ont confirmé l'absence d'ADN génomique dans les préparations d'ARNm (Figure 5.7 A et B, ligne 2 (5-HT_{2A}) et 5 (5-HT₇), page 202).

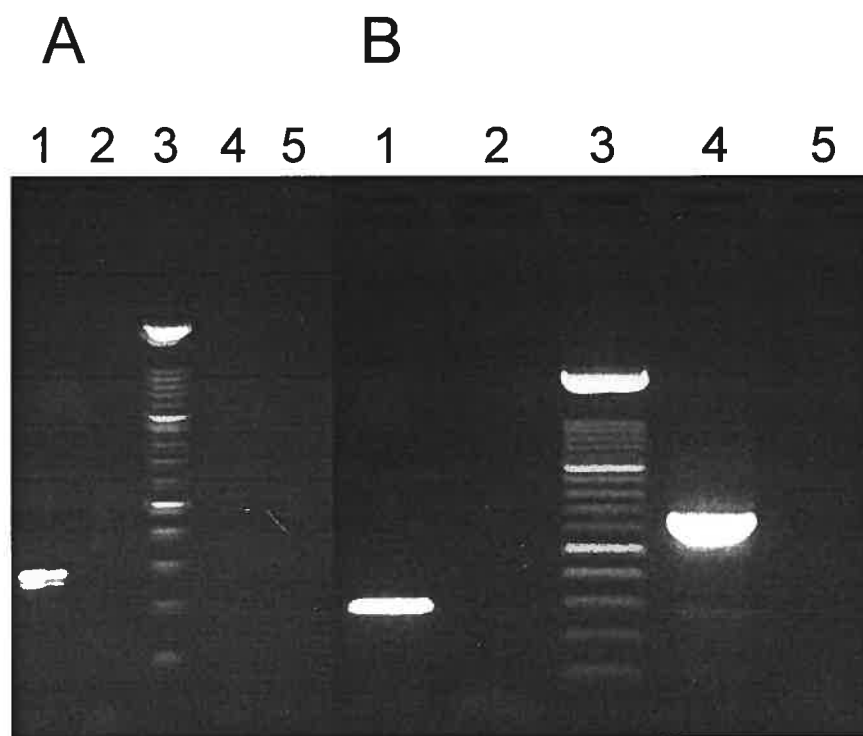


Figure 5.7 Expression de l'ARNm des récepteurs 5-HT₇ et 5-HT_{2A} dans les ovocytes et cellules du cumulus de hamster doré. Les produits chargés sur gel ont été obtenus par PCR niché sur des préparations d'ADNc d'ovocytes (A) ou de cellules du cumulus (B), à l'aide d'oligonucléotides spécifiques pour le récepteur 5-HT_{2A} (ligne 1, 288 pb) ou pour le récepteur 5-HT₇ (ligne 4, 642 pb). Les lignes 2 et 5 ont été chargées avec des produits d'une amplification sur des préparations d'ARNm sans reverse transcription, à l'aide d'oligonucléotides spécifiques pour le récepteur 5-HT_{2A} ou pour le récepteur 5-HT₇, respectivement. La ligne 3 a été chargée avec un marqueur-échelle de 100 pb.

Chapitre 6 :

Discussion générale et conclusion

6.1 La protéine oscilline comme facteur spermatique

Il faut souligner que l'étude de la régulation calcique des ovocytes de mammifères a été abordée en considérant deux effecteurs spermatiques potentiellement impliqués dans l'activation des ovocytes de souris à la fécondation : les protéines oscilline et tr-kit. La principale lacune du modèle d'activation ovocytaire par un facteur spermatique est l'absence d'identification de ce (ou ces) facteur(s) spermatique(s). La publication de travaux rendant compte de la purification, par chromatographie, d'une protéine de spermatozoïde de hamster, l'oscilline, dotée de la capacité de provoquer des oscillations calciques dans les ovocytes de souris et étant exprimée exclusivement dans les spermatozoïdes a donc été accueillie avec grand intérêt (Parrington *et al.*, 1996). Compte tenu de données suggérant l'universalité du mécanisme d'activation ovocytaire chez les mammifères, nous avons étudié l'expression de l'oscilline chez la souris, afin de poursuivre la caractérisation de la protéine chez un modèle animal reconnu et largement utilisé. Nos travaux ont mené au séquençage de l'homologue murin de l'oscilline de hamster et à la vérification de trois caractéristiques importantes d'un facteur spermatique injecté. La forte homologie de séquence de cette protéine entre les différentes espèces (hamster, souris et humain) était compatible avec la possibilité d'activation inter-espèces, tel qu'observé avec des facteurs injectés dans des ovocytes de souris (Parrington *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1997). Toutefois, l'expression ubiquitaire de la protéine et ce, jusque dans l'ovocyte lui-même, ne correspondait pas au fait que seule l'injection d'extraits spermatiques active l'ovocyte de mammifère (Wu *et al.*, 1997). Finalement, la localisation de l'oscilline dans la région acrosomiale et sa perte lors de la réaction de l'acrosome était incompatible avec son internalisation au moment de la fécondation et l'hypothèse d'un facteur spermatique injecté.

D'autres études publiées par divers groupes ont aussi menés à la disqualification de cette protéine comme facteur spermatique potentiel. Premièrement, il a été démontré que la GNPDA-oscilline était exprimée dans plusieurs tissus et non pas seulement dans le testicule ou le spermatozoïde, chez le rat et chez la souris (Wolosker *et al.*, 1998; Montag *et al.*, 1999). Deuxièmement, les GNPDA-oscillines recombinantes humaine et

de rat ne possèdent pas d'activité oscilline lorsqu'injectées dans les ovocytes de souris (Shevchenko *et al.*, 1998; Wolosker *et al.*, 1998; Wolny *et al.*, 1999). En outre, la protéine purifiée par chromatographie à partir de spermatozoïdes de hamster ou de porc ne possède pas d'activité oscilline (Wolosker *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998). Finalement, l'activité GNPDA de la protéine a été démontrée chez l'humain et le rat (Wolny *et al.*, 1999; Wolosker *et al.*, 1998). Cet ensemble de faits rapportés par différentes équipes et chez différentes espèces a donc écarté la GNPDA-oscilline des candidats potentiels au titre de facteur spermatique activateur.

6.2 La protéine tr-kit comme facteur spermatique

La protéine tr-kit a aussi été proposée comme activateur ovocytaire conformément au modèle d'un facteur spermatique injecté à la fécondation. En effet, son expression restreinte aux spermatides et aux spermatozoïdes, sa capacité d'activation des ovocytes de souris via un mécanisme sensible au BAPTA et l'implication de la PLC et d'inositol phosphate dans sa voie de transduction en faisaient un sérieux candidat (Albanesi *et al.*, 1996; Sette *et al.*, 1997; Sette *et al.*, 1998). Notre courte étude de tr-kit a permis de confirmer la restriction de son expression au testicule et de localiser la protéine dans la région du cou (intersection entre la pièce intermédiaire et le flagelle) et de l'acrosome. De plus, des résultats non publiés, obtenus dans la suite du projet, à l'aide d'un second anticorps dirigé contre la région C-terminale de c-kit, nous ont montré un marquage associé à tr-kit confiné à la région du cou du spermatozoïde. Nos résultats s'avéraient ainsi compatibles avec l'hypothèse d'une activation ovocytaire par injection de protéine tr-kit à la fécondation.

Cependant, d'autres résultats publiés au sujet de cette protéine ne sont pas venus étayer l'hypothèse voulant que tr-kit agisse en tant que facteur spermatique activateur. En effet, il n'a pas été démontré que l'injection de tr-kit dans les ovocytes provoquait des oscillations calciques et aucune donnée n'a été rapportée sur l'implication potentielle de tr-kit dans l'activation ovocytaire par d'autres groupes de recherche que celui qui a initialement identifié cette protéine. Les travaux de ce groupe de recherche italien ont

permis de démontrer que tr-kit forme un complexe moléculaire avec les protéines PLC γ 1, Fyn et Sam68 (Sette *et al.*, 2002; Paronetto *et al.*, 2003). La formation de ce complexe provoquerait la relâche d'ARN transporté par Sam68 près des ribosomes et permettrait ainsi la traduction d'ARNm maternels dormants. Le rôle de tr-kit à la fécondation ne serait donc pas celui d'un facteur spermatique injecté induisant des oscillations calciques.

6.3 La protéine PLC ζ comme facteur spermatique

La recherche des dernières années a mené à l'émergence d'un nouveau facteur spermatique activateur possédant plusieurs caractéristiques de cet ordre : la protéine PLC ζ . Cette nouvelle PLC, exprimée exclusivement dans le testicule, a été identifiée chez la souris, le hamster, le singe, l'humain et le porc, en accord avec la nature protéique, la spécificité d'expression et l'universalité d'un tel facteur activateur chez les mammifères (Cox *et al.*, 2002; Saunders *et al.*, 2002). Son poids moléculaire est d'environ 70 kDa, conformément à la valeur présumée d'un facteur spermatique de 29-68 kDa évaluée lors de la purification chromatographique d'extraits spermatiques actifs (Saunders *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'injection de l'ARNm de la PLC ζ ou d'une quantité de sa protéine recombinante équivalente à celle retrouvée dans un spermatozoïde induit une série d'oscillations calciques semblables à celles observées à la fécondation (Cox *et al.*, 2002; Saunders *et al.*, 2002; Kouchi *et al.*, 2004). De plus, la déplétion en PLC ζ d'extraits spermatiques de hamster par utilisation d'un anticorps spécifique ou déplétion en PLC ζ dans les spermatozoïdes de souris induite par une stratégie d'ARN interférence élimine la capacité des extraits ou réduit la capacité des spermatozoïdes à induire des oscillations calciques (Saunders *et al.*, 2002; Knott *et al.*, 2005). Finalement, il a été démontré qu'une PLC ζ recombinante couplée à une protéine fluorescente s'accumulait dans les pronuclei d'ovocytes de souris, en accord avec le phénomène de séquestration et d'arrêt des oscillations au moment de la formation des pronuclei (Jones *et al.*, 1995; Kono *et al.*, 1995; Marangos *et al.*, 2003). Toutes ces

données suggèrent que la PLC ζ est un régulateur du niveau de calcium des ovocytes et renforcent l'hypothèse d'une activation par injection d'un facteur spermatique.

6.4 La sérotonine comme régulateur calcique des ovocytes

Par la suite, nous avons abordé l'étude de la régulation calcique des ovocytes de souris en examinant la possibilité que la 5-HT agisse comme régulateur calcique ovocytaire en interaction avec un récepteur spécifique exprimé à la surface des ovocytes. Nous avons constaté que la 5-HT ne provoque pas d'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire dans les ovocytes de souris et que ceux-ci n'expriment pas un récepteur de la famille 5-HT₂. La souris et le hamster doré diffèrent donc à cet égard puisque les ovocytes de hamster répondent clairement à la 5-HT via un mécanisme sensible à des antagonistes de récepteur 5-HT_{2A} (Miyazaki *et al.*, 1990; Fujiwara *et al.*, 1993; Shiraishi *et al.*, 1995). Dans ces publications, la caractérisation pharmacologique du récepteur à 5-HT impliqué a été effectuée de façon partielle seulement. Néanmoins, les résultats complémentaires de notre étude par RT-PCR sont en accord avec cette caractérisation, puisqu'ils montrent une expression de l'ARNm du récepteur 5-HT_{2A} dans les ovocytes de hamster, à la différence des ovocytes de souris qui expriment plutôt le récepteur 5-HT₇.

Des études plus poussées seront nécessaires pour vérifier l'implication de la 5-HT dans la régulation calcique des ovocytes de hamster. Cependant, l'absence d'une telle régulation chez les ovocytes de souris indique clairement que la 5-HT n'est pas une molécule activatrice des ovocytes de mammifères selon le modèle ligand-récepteur.

Différentes démonstrations sont d'ailleurs venues mettre en doute la validité du modèle d'activation ligand-récepteur dans la génération d'oscillations de Ca²⁺ à la fécondation. Premièrement, il a été démontré que la fusion et non le simple contact des gamètes était nécessaire pour générer les oscillations calciques (Lawrence *et al.*, 1997). Deuxièmement, les oscillations calciques causées par l'injection d'IP₃ et de GTP γ S ne correspondent pas exactement au patron d'oscillations observées à la fécondation. De plus, un œuf polyspermique montre une variation dans la fréquence de ces oscillations, alors que l'injection de différentes quantités d'IP₃ montre des patrons d'amplitude

différente (Fissore *et al.*, 1995) : ce qui suggère un niveau de complexité supérieur à la simple activation d'un récepteur, dans la génération d'IP₃. Troisièmement, le rôle des PLC β et PLC γ de l'ovocyte a aussi été mis en doute du fait que l'inhibition des protéines G_s, G_i ou G_q (Moore *et al.*, 1994), ou l'injection de domaines SH2-PLC γ (jouant un rôle de dominant négatif), n'affectait pas les oscillations calciques observées à la fécondation (Mehlmann *et al.*, 1998). Ceci suggère que l'activation via une protéine G ou des protéines kinases est possible, mais qu'il ne s'agit pas de voies absolument nécessaires à la fécondation. Finalement, l'utilisation courante, dans les techniques de reproduction assistée, de l'ICSI, ainsi que la démonstration d'oscillations calciques normales par suite de ce traitement, montrent que le contact membranaire entre les deux gamètes est à tout le moins dispensable (Tesarik *et al.*, 1994). Par ailleurs, même si l'injection du facteur spermatique PLC ζ semble jouer un rôle central dans l'activation des ovocytes de mammifères, il a aussi été proposé que plusieurs mécanismes complémentaires agissaient en synergie avec ce facteur, permettant ainsi l'activation complète de l'ovocyte (Perry *et al.*, 1999; Tesarik and Mendoza, 1999; Sutovsky *et al.*, 2003).

6.5 Le système sérotoninergique des complexes ovocyte-cumulus

Nos études chez la souris nous ont donc mené à considérer la 5-HT non pas comme un simple régulateur calcique des ovocytes, mais plutôt comme un modulateur local de la communication inter-cellulaire du COC via l'expression d'un système sérotoninergique complet (Figure 6.1, page 210). En effet, les cellules du cumulus possèdent la capacité de synthétiser la 5-HT puisqu'elles expriment l'enzyme limitante de sa synthèse : la TPH1. L'activité de cette enzyme dans les cellules du cumulus reste à démontrer, mais sa présence et la présence de la 5-HT elle-même dans les cellules du cumulus en font la source locale de 5-HT la plus vraisemblable. Cette capacité de synthèse de la 5-HT par les cellules du cumulus permet l'autonomie du système sérotoninergique qui ne dépend pas alors d'une innervation ovarienne extérieure, de l'invasion tissulaire de mastocytes ou de la 5-HT sanguine circulante, tel que suggéré précédemment (Amenta *et al.*, 1992). De plus, l'expression de protéines associées aux vésicules dans les cellules du cumulus

(Grosse *et al.*, 2000) suggère que la 5-HT synthétisée soit stockée dans des vésicules pouvant fusionner avec la membrane plasmique de façon régulée. Ainsi, la 5-HT pourrait être relâchée pour agir de façon autocrine sur les cellules du cumulus elles-même, ou de façon paracrine, à l'extrémité des projections transzonales en contact avec l'ovocyte (Hertig and Adams, 1967; Anderson and Albertini, 1976; Motta *et al.*, 1994).

Au niveau des cellules du cumulus, la 5-HT pourrait alors interagir avec les récepteurs 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT₇ et ainsi réguler, comme nous avons pu le démontrer, le niveau d'AMPC et de Ca²⁺ de ces cellules (Figure 6.1, page 210). Nos données moléculaires et pharmacologiques suggèrent que l'augmentation de l'AMPC soit liée à la stimulation du récepteur 5-HT₇ et que l'augmentation du Ca²⁺ soit liée à la stimulation des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B}. En accord avec cette hypothèse, l'analyse par RT-PCR d'autres récepteurs couplés à G_s (les récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₆) ou à G_q (le récepteur 5-HT_{2C}) a démontré que ces sous-types de récepteurs ne sont pas exprimés dans les cellules du cumulus. Cependant, la possibilité que d'autres sous-types de récepteurs soient exprimés et la présence d'une signalisation croisée entre ces seconds messagers complique l'élucidation des voies de transduction et nécessitera une caractérisation pharmacologique et moléculaire plus poussée.

Au niveau de l'ovocyte, la 5-HT pourrait interagir avec le récepteur 5-HT₇ et le récepteur 5-HT_{1D} (nos résultats non démontrés; Vesela *et al.*, 2003; Il'kova *et al.*, 2004) pour réguler positivement ou négativement le niveau d'AMPC, mais la voie de transduction de ces récepteurs et le stade de maturation ovocytaire où ils sont fonctionnels reste à démontrer, puisque nous n'avons pas observé d'effet de la 5-HT sur la concentration d'AMPC ou de Ca²⁺ des ovocytes en métaphase II.

Après sa libération dans l'espace intercellulaire et son interaction avec des récepteurs membranaires, la 5-HT serait recaptée par un transporteur spécifique, exprimé à la fois par les cellules du cumulus et l'ovocyte et sensible aux SSRIs (Figure 6.1, page 210). Classiquement, ce transporteur permet de contrôler la distribution spatiale et temporelle de la 5-HT, et donc son interaction avec ses cibles pharmacologiques membranaires, en plus de permettre son recyclage vers une voie sécrétoire ou sa dégradation par la MAO intracellulaire (Frazer and Hensler, 1999). Au niveau des cellules du cumulus, la 5-HT pourrait donc être recyclée vers la voie sécrétoire, ou dégradée par la MAO, puisque les

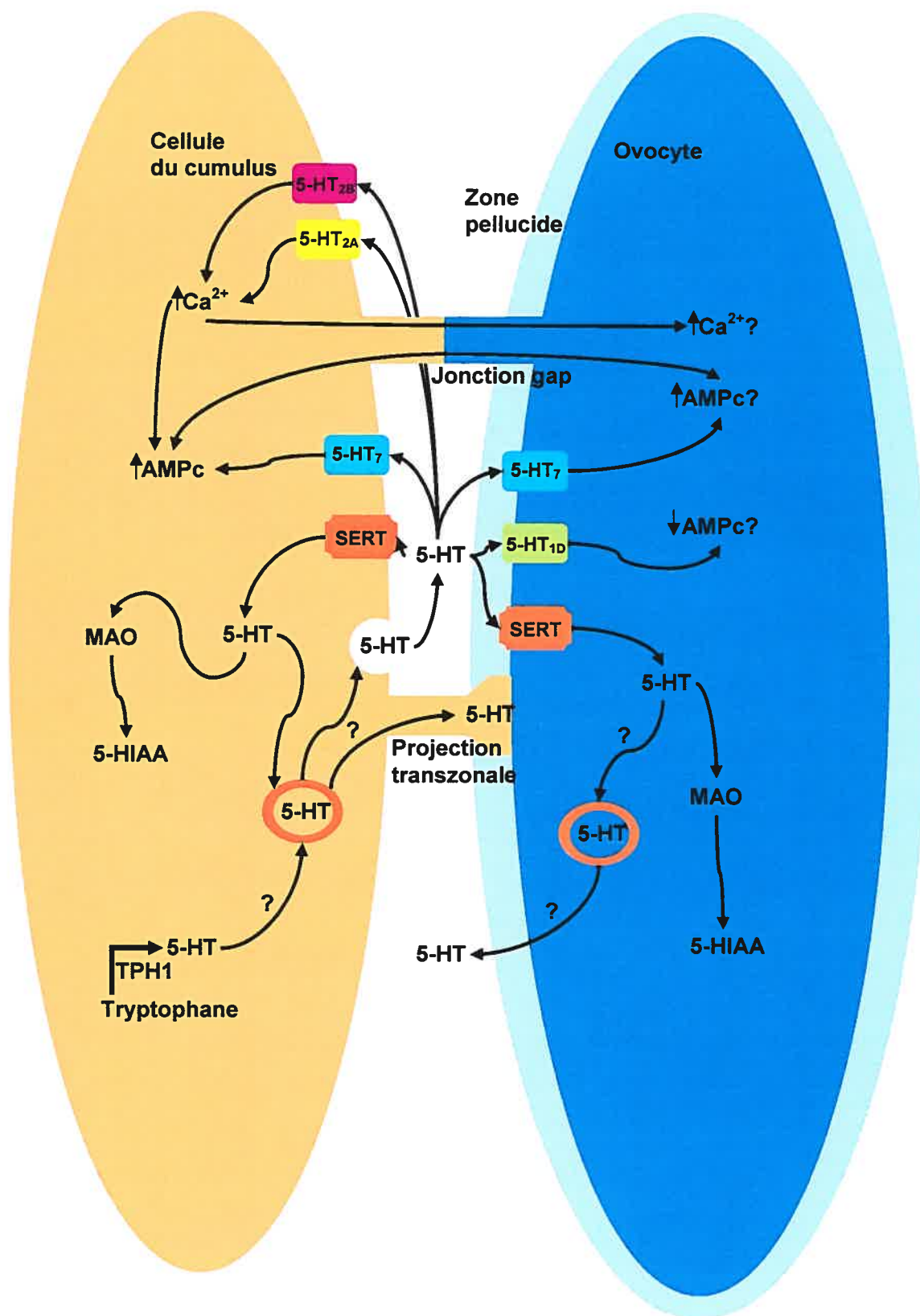


Figure 6.1 : Système sérotoninergique des complexes ovocyte-cumulus de souris.

Les cellules du cumulus expriment l'enzyme tryptophane hydroxylase 1 (TPH1) permettant la synthèse de la 5-HT. La 5-HT pourrait être relâchée dans l'espace intercellulaire via un mécanisme vésiculaire pour interagir avec différentes cibles pharmacologiques situées sur les cellules du cumulus elles-mêmes ou à l'extrémité de projections transzonales sur l'ovocyte. Les récepteurs 5-HT₇, 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B} permettent la régulation du niveau de Ca²⁺ et d'AMPc intracellulaire des cellules du cumulus et la variation du niveau de ces seconds messagers pourrait être transmis à l'ovocyte via les jonctions gap situées entre les deux compartiments cellulaires. Le niveau d'AMPc des ovocytes pourrait aussi être modulé directement par l'activation des récepteurs 5-HT₇ et 5-HT_{1D} exprimés à leur surface. Finalement, la 5-HT extracellulaire est recaptée par un transporteur spécifique à la 5-HT (SERT) exprimé par les cellules du cumulus et l'ovocyte et pourrait ainsi permettre la dégradation de la 5-HT par la monoamine oxydase ou être recyclée vers une voie de sécrétion.

COCs incubés pendant cinq heures dans une solution contenant de la 5-HT et du nialamide, montrent un niveau de 5-HT détectable par immunofluorescence, dans les cellules du cumulus et les ovocytes et plus élevé que celui des cellules incubées en présence de 5-HT seule (données non présentées). Dans l'ovocyte, la 5-HT pourrait aussi être dégradée par la MAO exprimée par ceux-ci, ou réutilisée par une voie sécrétoire dont l'existence reste à démontrer. Cette hypothèse est intéressante puisque les ovocytes expriment aussi des protéines vésiculaires (Grosse *et al.*, 2000), lesquelles pourraient permettre à l'ovocyte d'utiliser la 5-HT comme messager autocrine et paracrine, en accord avec la communication bidirectionnelle nécessaire à une folliculogénèse adéquate (Matzuk *et al.*, 2002a).

Alternativement, la 5-HT intracellulaire des ovocytes et cellules du cumulus pourrait permettre l'activation de récepteurs intracellulaires (Muneoka and Takigawa, 2003) ou la sérotonylation de GTPases cytoplasmiques (Walther *et al.*, 2003b), tel que démontré dans d'autres systèmes sérotoninergiques. Le (ou les) rôle(s) physiologique exact permis par l'internalisation de la 5-HT restent donc à démontrer. La présence de l'enzyme de synthèse, de la 5-HT elle-même, du transporteur à 5-HT, de récepteurs à 5-HT et de l'enzyme de dégradation confirme la présence d'un système sérotoninergique dans les COCs de souris (Figure 6.1, page 210).

6.6 Fonctions potentielles du système sérotoninergique des complexes ovocyte-cumulus

Notre étude s'est consacrée à l'identification et à la caractérisation d'un tel système sérotoninergique dans un modèle cellulaire restreint : le COC de souris. Toutefois, étant donné la parenté évidente entre l'ovocyte en métaphase II et l'ovocyte en prophase I, et celle entre les cellules du cumulus et les cellules de la granulosa, il est tentant de spéculer que le système sérotoninergique identifié ici puisse fonctionner comme un modulateur local des hormones gonadotrophines et stéroïdes lors de la folliculogénèse. En effet, la présence de nombreux messagers intercellulaires nécessaires au bon développement du follicule, l'expression du récepteur 5-HT_{2A} dans toutes les

populations de cellules de la granulosa (données non démontrées) et la présence de 5-HT dans le liquide folliculaire chez l'humain (Bodis *et al.*, 1992a; Bodis *et al.*, 1993) supportent cette hypothèse. De plus, la démonstration chez le hamster, le rat, l'humain, le porc et la vache d'un effet stimulateur de la 5-HT sur la stéroïdogénèse folliculaire supporte aussi l'hypothèse d'un rôle intra-ovarien d'un tel système chez les mammifères en général (Battista and Condon, 1986; Battista *et al.*, 1987; Terranova *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1993; Sirotkin, 1995; Graveleau *et al.*, 2000; Koppan *et al.*, 2004).

Un tel système sérotoninergique dans le follicule ovarien pourrait aussi affecter directement l'ovocyte en prophase I. En effet, même si nous avons pu démontrer que la 5-HT ne régule pas directement le niveau de Ca^{2+} des ovocytes de souris en métaphase II, il est connu que la 5-HT peut réguler directement le niveau calcique des ovocytes de hamster doré et ce, probablement via l'activation d'un récepteur 5-HT_{2A} (Miyazaki *et al.*, 1990; Fujiwara *et al.*, 1993; Shiraishi *et al.*, 1995). L'intérêt de ce dernier modèle tient aussi à la détection de l'ARNm du récepteur 5-HT_{2A} dans les ovocytes humains, suggérant qu'il existe une analogie plus importante entre les modèles hamster et humain qu'avec le modèle souris (Neilson *et al.*, 2000). De plus, il a été démontré que l'ovocyte de hamster en prophase I est plus sensible à la 5-HT que l'ovocyte en métaphase II, suggérant un rôle de la régulation calcique par la 5-HT pendant la maturation ovocytaire chez cette espèce (Fujiwara *et al.*, 1993). Outre l'ARNm du récepteur 5-HT_{2A}, nous avons pu détecter la présence de 5-HT et d'un mécanisme d'internalisation de la 5-HT dans les ovocytes de hamster. La présence de l'ARNm des récepteurs 5-HT₇ et 5-HT_{2A} dans les cellules du cumulus de hamster doré suggère aussi une régulation de ces cellules par la 5-HT et supporte l'hypothèse de l'expression d'un système sérotoninergique dans le follicule des mammifères en général. Si la régulation calcique des ovocytes de souris est nécessaire pendant la folliculogénèse avant le pic pré-ovulatoire de LH, il est possible que la 5-HT puisse influencer le niveau calcique des ovocytes de souris indirectement. En effet, la présence de jonctions "gap" entre l'ovocyte et les cellules du cumulus pourrait permettre aux ions Ca^{2+} libérés par la 5-HT dans les cellules du cumulus d'être transmis à l'ovocyte (Figure 6.1, page 210). Une telle augmentation de Ca^{2+} ovocytaire, médiée par la stimulation d'un récepteur situé sur les cellules du cumulus, a d'ailleurs été démontrée chez la souris (Webb *et al.*, 2002a).

Cette différence d'expression entre deux espèces aussi rapprochées que la souris et le hamster soulève la question de la conservation des rôles physiologiques généraux de la 5-HT et plus particulièrement de son rôle dans la régulation locale de la fonction reproductrice à travers le règne animal. Les systèmes sérotoninergiques sont très anciens et ont vu leur rôle s'adapter au cours de l'évolution. Chez les mammifères, ils agissent comme systèmes de communication inter- et intra-cellulaires qui s'exécutent de manière autocrine, paracrine et possiblement intracrine et ce, dans tous les grands systèmes et tissus. Cette variété de phénomènes physiologiques régulés par la 5-HT est permise par l'existence d'une grande diversité de récepteurs stimulables et par la présence de mécanismes modulables de synthèse, de recapture, d'internalisation et de dégradation.

Un bon exemple de fonction physiologique conservée chez les mammifères et modulée par un système sérotoninergique est la stéroïdogénèse. En effet, une influence locale de la 5-HT est observée dans les trois principaux tissus stéroïdogéniques mammifères : la glande surrénale (Delarue *et al.*, 2001), le testicule (Dufau *et al.*, 1993) et l'ovaire (voir références de la section 3.3.3). Malgré le manque de données concernant les voies de transduction qui relient l'activation d'un récepteur par la 5-HT à la modulation de la transcription, de la traduction ou de l'activité des enzymes stéroïdogéniques, les données actuelles suggèrent que la réponse stéroïdogénique de ces tissus peut être modulée par un système sérotoninergique. Dans la surrénale, les données laissent croire que ce système sérotoninergique inclut la présence de 5-HT locale, d'un transporteur à 5-HT dans les cellules sensibles, d'un récepteur à 5-HT de type 5-HT₄ ou 5-HT₇ selon l'espèce, d'une mobilisation de seconds messagers comme l'AMPc et le Ca²⁺ intracellulaire et d'une enzyme de dégradation comme la MAO-A (voir références de la section 3.3.1). Nous avons pu démontrer que toutes ces composantes, y compris la MAO, se retrouvent aussi dans le COC et plus particulièrement dans les cellules du cumulus chez la souris. De plus, de nombreux auteurs ont rapporté une influence positive de la 5-HT sur la stéroïdogénèse des follicules ou des cellules de granulosa en culture (Battista and Condon, 1986; Battista *et al.*, 1987; Terranova *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1993; Sirotkin, 1995; Graveleau *et al.*, 2000; Koppan *et al.*, 2004). La similitude entre les systèmes sérotoninergiques

surrénaux et ovariens et les données sur l'influence positive de la 5-HT sur la stéroïdogénèse folliculaire suggèrent fortement qu'une telle fonction physiologique soit accomplie par le système sérotoninergique présent dans les COCs. Cependant, nos résultats ont été obtenus sur des cellules du cumulus, alors que les données de la littérature concernent des follicules complets (le type cellulaire ciblé n'a pas été identifié, mais implique probablement des cellules de la granulosa murales et péri-antrales) ou des cellules lutéales et de granulosa en culture (qui se lutéinisent). Puisque les cellules du cumulus, les cellules de la granulosa et les cellules lutéales ont des propriétés stéroïdogéniques différentes, il faudra confirmer l'expression des récepteurs 5-HT_{2A} 5-HT_{2B} et 5-HT₇ dans ces sous-populations cellulaires afin de vérifier qu'ils sont responsables de la transduction du signal. Jusqu'à maintenant, les données pharmacologiques paraissent en accord avec cette hypothèse puisque l'agoniste 8-OH DPAT stimule la stéroïdogénèse chez le hamster et que l'antagoniste kétansérine inhibe l'effet stimulant de la 5-HT chez le rat (Terranova *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1993). De plus, des expériences d'immunofluorescence indirecte, à l'aide d'un anticorps anti-5-HT_{2A}, sur des coupes d'ovaire de souris ont permis d'observer un marquage des différentes sous-populations des cellules de la granulosa à tous les stades de développement folliculaire (données non présentées).

Au-delà de la capacité de la 5-HT à réguler la stéroïdogénèse en général, il est difficile pour le moment de tracer un lien direct entre nos données recueillies sur le système sérotoninergique des COCs, l'effet stimulant de la 5-HT sur la stéroïdogénèse folliculaire et son effet inhibiteur sur la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig. Néanmoins, il existe une similarité entre les compartiments FSH-sensibles des cellules de Sertoli et de la granulosa et LH-sensibles des cellules de Leydig et de la thèque interne dans la régulation de la gamétogénèse chez le mâle et la femelle (Leung and Steele, 1992). Ainsi, la 5-HT pourrait avoir un effet stimulant sur la stéroïdogénèse du compartiment FSH-sensible et un effet inhibiteur sur celle du compartiment LH-sensible. Autrement, il est possible de considérer que le rôle de la 5-HT ait évolué différemment entre la stéroïdogénèse des gonades mâles et femelles et que l'effet modulateur ait été conservé plutôt qu'un effet stimulant ou inhibiteur. Quoiqu'il en

soit, des études supplémentaires, tant sur la gonade mâle que femelle, seront nécessaires pour vérifier ces hypothèses.

L'interaction entre les systèmes stéroïdiens et sérotoninergiques est bidirectionnelle. En effet, les hormones stéroïdes peuvent réguler le niveau d'expression des membres d'un système sérotoninergique. Ceci n'a jamais été démontré dans l'ovaire lui-même, mais a été l'objet de nombreuses études au niveau du SNC. Par exemple, il a été démontré que les niveaux de la TPH, du SERT, du récepteur 5-HT_{2A} et de la MAO-A étaient influencés par le stade du cycle ovarien et les niveaux circulants d'estrogène et de progestérone (Bethea *et al.*, 1998; Fink *et al.*, 1998). Puisque les cellules du follicule sont le site de synthèse des stéroïdes, ont la capacité de répondre aux stéroïdes et expriment ces composantes sérotoninergiques, la présence d'un tel mécanisme de régulation entre les deux systèmes au niveau folliculaire est fort probable, mais reste à démontrer. L'influence bidirectionnelle de ces deux systèmes au niveau folliculaire pourrait donc avoir un impact majeur sur la folliculogénèse.

La 5-HT pourrait aussi avoir conservé un rôle comme régulateur intra-gonadique des cellules somatiques et des ovocytes, chez une variété d'espèces et ce, des invertébrés marins aux mammifères. En effet, la similarité structurelle entre les fibres sérotoninergiques entourant les acini contenant les ovocytes chez les bivalves *Patinopecten yessoensis* (Matsutani and Nomura, 1986), *Dreissena polymorpha* (Ram *et al.*, 1992) et *Spisula solidissima* (Masseau *et al.*, 2002) et les cellules du cumulus contenant la 5-HT et entourant l'ovocyte chez la souris est évidente. Cette similarité ne signifie toutefois pas nécessairement un rôle identique de la 5-HT sur le compartiment somatique de la gonade puisque les différences sont nombreuses entre la physiologie reproductrice des bivalves et des mammifères.

Cependant, la présence de 5-HT ou d'un système sérotoninergique dans les cellules somatiques de la gonade pourrait être répandue à l'ensemble du règne animal et pourrait s'être adaptée au fil de l'évolution selon les besoins particuliers de chaque organisme. S'agissant du niveau de l'effet direct de la 5-HT sur les ovocytes, les données obtenues chez les invertébrés marins, les némertes, le poisson *Fundulus heteroclitus* et les grenouilles indiquent un rôle de la 5-HT dans la régulation de la maturation méiotique des ovocytes arrêtés en prophase I. Nous n'avons pas accumulé assez de données

concernant les ovocytes en prophase I de souris pour savoir si les récepteurs 5-HT₇ et 5-HT_{1D} exprimés par l'ovocyte étaient impliqués dans le maintien en arrêt méiotique ou la stimulation de la reprise de la méiose au moment du pic de LH. Cependant, ces deux récepteurs sont reconnus pour réguler le niveau d'AMPc dans d'autres types cellulaires, alors que le niveau d'AMPc de l'ovocyte est intimement lié à la maturation nucléaire de l'ovocyte (Conti *et al.*, 2002; Eppig *et al.*, 2004) suggérant qu'ils puissent permettre la modulation paracrine de ce processus. Chez les nombreux invertébrés étudiés, la 5-HT stimule la reprise de la méiose, alors que chez les vertébrés, la 5-HT inhibe la reprise de la méiose induite par un stéroïde activateur. Il est donc possible que, au cours de l'évolution, la 5-HT soit passée d'un rôle de stimulateur principal de la reprise de la méiose (invertébrés) à un rôle de modulateur local de l'action des gonadotrophines (organismes possédant un système endocrinien plus élaboré). Des études plus poussées seront nécessaires pour vérifier le stade où ces récepteurs à 5-HT ovocytaires sont fonctionnels, et déterminer leur(s) voie(s) de transduction, ainsi que le rôle physiologique qu'ils jouent *in vivo*.

6.7 La sérotonine et le développement embryonnaire pré-implantatoire

Nous avons aussi abordé l'implication potentielle de la 5-HT dans l'embryogénèse pré-implantatoire en étendant nos études de RT-PCR et d'immunofluorescence indirecte aux embryons de divers stades. Ainsi, nous avons démontré que les embryons pré-implantatoires contiennent de la 5-HT et qu'ils peuvent l'accumuler via l'expression d'un transporteur spécifique sensible aux SSRIs. Il a été rapporté que les embryons 1 cellule de souris expriment la TPH1 et que cette expression est stimulée par la fécondation puisque la TPH1 n'est pas détectable dans les ovocytes (Walther and Bader, 1999). Notre étude par RT-PCR n'a pas permis de confirmer cette expression et la mauvaise qualité de la figure d'immunofluorescence indirecte de la publication en question nous suggère que les ovocytes et embryons pré-implantatoires de souris n'expriment pas la TPH1. La présence de la 5-HT dans les embryons serait donc due à la recapture de la 5-HT présente dans le tractus génital femelle (Amenta *et al.*, 1992) et

non pas à une synthèse par l'embryon. L'expression du SERT et du récepteur 5-HT_{1D} (Vesela *et al.*, 2003) du stade 1 cellule à blastocyste, ainsi que celle du récepteur 5-HT₇ jusqu'au stade 4 cellules suggèrent que la 5-HT puisse réguler certains processus liés à l'embryogénèse pré-implantatoire. D'ailleurs, la culture *in vitro* d'embryons de souris dans un milieu contenant de la 5-HT ou du sumatriptan réduit le nombre de cellules et le pourcentage de blastocystes formés, probablement via l'activation du récepteur 5-HT_{1D} (Vesela *et al.*, 2003; Il'kova *et al.*, 2004), alors que le rôle exact du récepteur 5-HT₇ et du SERT dans l'embryogénèse reste à démontrer.

6.8 Contribution éventuelle des modèles de souris « knockout »

L'étude et la compréhension, *in vivo*, des mécanismes de régulation de l'embryogénèse, de la folliculogénèse et de l'ovogénèse s'avère très complexe parce qu'elle implique une variété de facteurs et de systèmes qui agissent en synergie et qu'on ne peut habituellement reproduire lors des études *in vitro*. Cependant, les modèles de souris "knockout" permettent d'isoler l'effet de l'inactivation d'un gène unique et ainsi d'évaluer le rôle particulier joué par ce gène dans la physiologie de l'animal étudié. Plusieurs souris "knockout" pour des gènes codant un membre du système sérotoninergique exprimé dans le système reproducteur, par exemple la TPH1 (Côté *et al.*, 2003), le SERT (Bengel *et al.*, 1998), la MAO-A (Cases *et al.*, 1995), le récepteur 5-HT_{2B} (Nebigil *et al.*, 2000) et le récepteur 5-HT₇ (Hedlund *et al.*, 2003) ont déjà été produites, mais n'ont pas été étudié en fonction du rôle possible joué par ce gène dans la physiologie reproductrice de l'animal. Jusqu'à maintenant, le "knockout" de ces gènes a permis de constater que le rôle joué par l'un ou l'autre d'entre eux n'était pas essentiel, puisque les souris restaient viables et fertiles. Seule la souris "knockout" pour le récepteur 5-HT_{2B} montre une baisse de sa fertilité en plus d'une morphogénèse cardiaque anormale (Nebigil *et al.*, 2000). L'étude approfondie de chacun de ces modèles "knockout" dans le contexte de la physiologie ovarienne devrait permettre de mieux comprendre le rôle joué par chacun d'eux dans les processus d'ovogénèse et de folliculogénèse. L'étude de l'expression de toutes les composantes sérotoninergiques

identifiées jusqu'à maintenant dans les COCs pourraient aussi être effectuée par hybridation *in situ* sur des coupes d'ovaire. Cette approche permettrait d'évaluer les types cellulaires et folliculaires où les gènes sont exprimés et de cibler les stades du développement folliculaire où la 5-HT joue un rôle.

6.9 Implications cliniques potentielles

L'expression d'un système sérotoninergique régulant l'ovogénèse, la folliculogénèse et l'embryogénèse implique la possibilité que la prise de médicaments ayant pour cibles les membres d'un système sérotoninergique produise des effets secondaires affectant la fonction reproductrice. Par exemple, la prise d'antidépresseurs de la famille des SSRIs pourrait avoir un impact sur la fonction reproductrice et ce, à des stades plus précoces que ceux prévus et étudiés jusqu'à maintenant. À ce sujet, une augmentation du risque de multiples malformations mineures a déjà été rapportée chez les fœtus de premier trimestre exposés à la fluoxétine (Chambers *et al.*, 1996). Cependant, la plupart des études menées jusqu'à maintenant n'indiquent pas une augmentation des risques d'avortement ou de malformations congénitales majeures par suite d'exposition aux SSRIs pendant le premier trimestre de la grossesse (Nonacs and Cohen, 2003). Notre démonstration de l'expression d'un système sérotoninergique dans les COCs souligne néanmoins que les drogues sérotoninergiques comme les antidépresseurs de la famille des SSRIs, dont l'usage est très répandu chez l'humain, devraient être réévaluées quant à leurs effets possibles sur les stades précoces des fonctions reproductrices.

Bibliographie

Abdelmajid H, Rivautier P, Krantic S and Guerrier P (1994) Differences in tyrosine phosphorylation of oocyte key proteins during 5HT-induced meiosis reinitiation in two bivalve species. *Experimental Cell Research* 212:422-425.

Albanesi C, Geremia R, Giorgio M, Dolci S, Sette C and Rossi P (1996) A cell- and developmental stage-specific promoter drives the expression of a truncated c-kit protein during mouse spermatid elongation. *Development* 122:1291-1302.

Albertini DF and Rider V (1994) Patterns of intercellular connectivity in the mammalian cumulus-oocyte complex. *Microscopy Research and Technique* 27:125-133.

Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E and Carabatsos MJ (2001) Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 121:647-653.

Alcazar SN, Solis EP and Alcala AC (1987) Serotonin-induced spawning and larval rearing of the China clam, *Hipposus porcellanus* Rosewater (Bivalvia: Tridacnidae). *Aquaculture* 66:359-368.

Alcolea S, Theveniau-Ruissy M, Jarry-Guichard T, Marics I, Tzouanacou E, Chauvin JP, Briand JP, Moorman AF, Lamers WH and Gros DB (1999) Downregulation of connexin 45 gene products during mouse heart development. *Circulation Research* 84:1365-1379.

Allworth AE and Albertini DF (1993) Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Developmental Biology* 158:101-112.

Alvarado-alvarez R, Gould MC and Stephano JL (1996) Spawning, in vitro maturation, and changes in oocyte electrophysiology induced by serotonin in *Tivela stultorum*. *Biological Bulletin* 190:322-328.

- Amenta F, Vega JA, Ricci A and Collier WL (1992) Localization of 5-hydroxytryptamine-like immunoreactive cells and nerve fibers in the rat female reproductive system. *Anatomical Record* 233:478-484.
- Amsterdam A, Koch Y, Lieberman ME and Lindner HR (1975) Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *Journal of Cell Biology* 67:894-900.
- Anderson E and Albertini DF (1976) Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *Journal of Cell Biology* 71:680-686.
- Antczak M, Van Blerkom J and Clark A (1997) A novel mechanism of vascular endothelial growth factor, leptin and transforming growth factor-beta2 sequestration in a subpopulation of human ovarian follicle cells. *Human Reproduction* 12:2226-2234.
- Apa R, Lanzone A, Miceli F, Mastrandrea M, Caruso A, Mancuso S and Canipari R (1994) Growth hormone induces in vitro maturation of follicle- and cumulus-enclosed rat oocytes. *Molecular & Cellular Endocrinology* 106:207-212.
- Arendsen dW-E (1982) Influence of gonadotrophins on early follicle cell development and early oocyte growth in the immature rat. *Journal of Reproduction & Fertility* 66:537-542.
- Armstrong DT, Xia P, de Gannes G, Tekpetey FR and Khamsi F (1996) Differential effects of insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone on proliferation and differentiation of bovine cumulus cells and granulosa cells. *Biology of Reproduction* 54:331-338.
- Artini PG, Battaglia C, D'Ambrogio G, Barreca A, Droghini F, Volpe A and Genazzani AR (1994) Relationship between human oocyte maturity, fertilization and follicular fluid growth factors. *Human Reproduction* 9:902-906.
- Ashman LK (1999) The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31:1037-1051.

Avazeri N, Courtot AM and Lefevre B (2004) Regulation of spontaneous meiosis resumption in mouse oocytes by various conventional PKC isozymes depends on cellular compartmentalization. *Journal of Cell Science* 117:4969-4978.

Bach AW, Lan NC, Johnson DL, Abell CW, Bembenek ME, Kwan SW, Seeburg PH and Shih JC (1988) cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:4934-4938.

Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM, Krobert KA, Brattelid T, Kaumann AJ and Levy FO (2001) 5HT4(a) and 5-HT4(b) receptors have nearly identical pharmacology and are both expressed in human atrium and ventricle. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 363:146-160.

Bachvarova RF, Burns JP, Spiegelman I, Choy J and Chaganti RS (1982) Morphology and transcriptional activity of mouse oocyte chromosomes. *Chromosoma* 86:181-196.

Bachvarova RF (1992) A maternal tail of poly(A): the long and the short of it. *Cell* 69:895-897.

Bai F, Yin T, Johnstone EM, Su C, Varga G, Little SP and Nelson DL (2004) Molecular cloning and pharmacological characterization of the guinea pig 5-HT1E receptor. *European Journal of Pharmacology* 484:127-139.

Baker LP, Nielsen MD, Impey S, Metcalf MA, Poser SW, Chan G, Obrietan K, Hamblin MW and Storm DR (1998) Stimulation of type 1 and type 8 Ca²⁺/calmodulin-sensitive adenylyl cyclases by the Gs-coupled 5-hydroxytryptamine subtype 5-HT7A receptor. *Journal of Biological Chemistry* 273:17469-17476.

Ball GD, Bellin ME, Ax RL and First NL (1982) Glycosaminoglycans in bovine cumulus-oocyte complexes: morphology and chemistry. *Molecular & Cellular Endocrinology* 28:113-122.

Bard JA, Zgombick J, Adham N, Vaysse P, Branchek TA and Weinshank RL (1993) Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry* 268:23422-23426.

Barnes NM and Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083-1152.

Battista PJ and Condon WA (1986) Serotonin-induced stimulation of progesterone production by cow luteal cells in vitro. *Journal of Reproduction & Fertility* 76:231-238.

Battista PJ, Rexroad CE, Jr. and Condon WA (1987) Mechanisms involved in the action of serotonin-induced stimulation of progesterone production by bovine luteal cells in vitro. *Molecular & Cellular Endocrinology* 51:145-151.

Bengel D, Murphy DL, Andrews AM, Wichems CH, Feltner D, Heils A, Mossner R, Westphal H and Lesch KP (1998) Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Molecular Pharmacology* 53:649-655.

Berg KA, Clarke WP, Chen Y, Ebersole BJ, McKay RD and Maayani S (1994) 5-Hydroxytryptamine type 2A receptors regulate cyclic AMP accumulation in a neuronal cell line by protein kinase C-dependent and calcium/calmodulin-dependent mechanisms. *Molecular Pharmacology* 45:826-836.

Berg KA, Maayani S, Goldfarb J, Scaramellini C, Leff P and Clarke WP (1998) Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. *Molecular Pharmacology* 54:94-104.

Berry MD, Juorio AV, Li XM and Boulton AA (1996) Aromatic L-amino acid decarboxylase: a neglected and misunderstood enzyme. *Neurochemical Research* 21:1075-1087.

Bethea CL, Pecins-Thompson M, Schutzer WE, Gundlach C and Lu ZN (1998) Ovarian steroids and serotonin neural function. *Molecular Neurobiology* 18:87-123.

Bevans CG, Kordel M, Rhee SK and Harris AL (1998) Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *Journal of Biological Chemistry* 273:2808-2816.

Bhalla P, Saxena PR and Sharma HS (2002) Molecular cloning and tissue distribution of mRNA encoding porcine 5-HT₇ receptor and its comparison with the structure of other species. *Molecular & Cellular Biochemistry* 238:81-88.

Bhatnagar S, Nowak N, Babich L and Bok L (2004) Deletion of the 5-HT₃ receptor differentially affects behavior of males and females in the Porsolt forced swim and defensive withdrawal tests. *Behavioral Brain Research* 153:527-535.

Biggers JD, Whittingham DG and Donahue RP (1967) The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 58:560-567.

Billett EE (2004) Monoamine oxidase (MAO) in human peripheral tissues. *Neurotoxicology* 25:139-148.

Bjersing L and Cartensen H (1964) The role of the granulosa cell in the biosynthesis of ovarian steroid hormones. *Biochimica et Biophysica Acta* 86:639-640.

Blakely RD, Berson HE, Freneau RT, Caron MG, Peek MM, Prince HK and Bradley CC (1991) Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. *Nature* 354:66-70.

Blakely RD, Ramamoorthy S, Schroeter S, Qian Y, Apparsundaram S, Galli A and DeFelice LJ (1998a) Regulated phosphorylation and trafficking of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins. *Biological Psychiatry* 44:169-178.

Blakely RD, Ramamoorthy S, Schroeter S, Qian Y, Apparsundaram S, Galli A and DeFelice LJ (1998b) Regulated phosphorylation and trafficking of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins. *Biological Psychiatry* 44:169-178.

Bleil JD and Wassarman PM (1980a) Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Developmental Biology* 76:185-202.

Bleil JD and Wassarman PM (1980b) Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77:1029-1033.

Bliziotis MM, Eshleman AJ, Zhang XW and Wiren KM (2001) Neurotransmitter action in osteoblasts: expression of a functional system for serotonin receptor activation and reuptake. *Bone* 29:477-486.

Blondel O, Vandecasteele G, Gastineau M, Leclerc S, Dahmoune Y, Langlois M and Fischmeister R (1997) Molecular and functional characterization of a 5-HT₄ receptor cloned from human atrium. *FEBS Letters* 412:465-474.

Blondel O, Gastineau M, Dahmoune Y, Langlois M and Fischmeister R (1998) Cloning, expression, and pharmacology of four human 5-hydroxytryptamine 4 receptor isoforms produced by alternative splicing in the carboxyl terminus. *Journal of Neurochemistry* 70:2252-2261.

Bockaert J, Claeysen S, Compan V and Dumuis A (2004) 5-HT₄ receptors. *Current Drug Targets CNS & Neurological Disorders* 3:39-51.

Bodis J, Bogнар Z, Hartmann G, Torok A and Csaba IF (1992a) Measurement of noradrenaline, dopamine and serotonin contents in follicular fluid of human graafian follicles after superovulation treatment. *Gynecologic & Obstetric Investigation* 33:165-167.

Bodis J, Torok A, Tinneberg HR, Hanf V, Hamori M and Cledon P (1992b) Influence of serotonin on progesterone and estradiol secretion of cultured human granulosa cells. *Fertility & Sterility* 57:1008-1111.

Bodis J, Hartmann G, Torok A, Bogнар Z, Tinneberg HR, Cledon P and Hanf V (1993) Relationship between the monoamine and gonadotropin content in follicular fluid of

preovulatory graafian follicles after superovulation treatment. *Experimental & Clinical Endocrinology* 101:178-182.

Boess FG, Monsma FJ, Jr., Carolo C, Meyer V, Rudler A, Zwingelstein C and Sleight AJ (1997) Functional and radioligand binding characterization of rat 5-HT₆ receptors stably expressed in HEK293 cells. *Neuropharmacology* 36:713-720.

Bogovich K and Richards JS (1982) Androgen biosynthesis in developing ovarian follicles: evidence that luteinizing hormone regulates thecal 17 alpha-hydroxylase and C17-20-lyase activities. *Endocrinology* 111:1201-1208.

Bonhaus DW, Bach C, DeSouza A, Salazar FH, Matsuoka BD, Zuppan P, Chan HW and Eglen RM (1995) The pharmacology and distribution of human 5-hydroxytryptamine_{2B} (5-HT_{2B}) receptor gene products: comparison with 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *British Journal of Pharmacology* 115:622-628.

Borman RA, Tilford NS, Harmer DW, Day N, Ellis ES, Sheldrick RL, Carey J, Coleman RA and Baxter GS (2002) 5-HT(2B) receptors play a key role in mediating the excitatory effects of 5-HT in human colon in vitro. *British Journal of Pharmacology* 135:1144-1151.

Bornslaeger EA, Mattei P and Schultz RM (1986) Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Developmental Biology* 114:453-462.

Bos-Mikich A, Whittingham DG and Jones KT (1997) Meiotic and mitotic Ca²⁺ oscillations affect cell composition in resulting blastocysts. *Developmental Biology* 182:172-179.

Bouchard S and Roberge AG (1979) Biochemical properties and kinetic parameters of dihydroxyphenylalanine--5-hydroxytryptophan decarboxylase in brain, liver, and adrenals of cat. *Canadian Journal of Biochemistry* 57:1014-1018.

Boularand S, Darmon MC, Ravassard P and Mallet J (1995) Characterization of the human tryptophan hydroxylase gene promoter. Transcriptional regulation by cAMP

requires a new motif distinct from the cAMP-responsive element. *Journal of Biological Chemistry* 270:3757-3764.

Bowsher RR and Henry D P (1986) Aromatic L-amino acid decarboxylase: biochemistry and functional significance, in *Neuromethods 5: Series 1: Neurochemistry, Neurotransmitter Enzymes* (Boulton AA, Baker GB and Yu PH eds) pp 33-77, Humana Press, Clifton.

Boyd GS, Arthur JR, Beckett GJ, Mason JI and Trzeciak WH (1975) The role of cholesterol and cytochrome P-450 in the cholesterol side chain cleavage reaction in adrenal cortex and corpora lutea. *Journal of Steroid Biochemistry* 6:427-436.

Brannstrom M, Norman RJ, Seamark RF and Robertson SA (1994) Rat ovary produces cytokines during ovulation. *Biology of Reproduction* 50:88-94.

Bruinvels AT, Landwehrmeyer B, Gustafson EL, Durkin MM, Mengod G, Branchek TA, Hoyer D and Palacios JM (1994) Localization of 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} α , 5-HT_{1E} and 5-HT_{1F} receptor messenger RNA in rodent and primate brain. *Neuropharmacology* 33:367-386.

Bruzzone R, White TW and Goodenough DA (1996a) The cellular Internet: on-line with connexins. *Bioessays* 18:709-718.

Bruzzone R, White TW and Paul DL (1996b) Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *European Journal of Biochemistry* 238:1-27.

Buccione R, Schroeder AC and Eppig JJ (1990) Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction* 43:543-547.

Burkitt HG, Young B and Heath J W (1993) *Wheater's Functional Histology*. Churchill Livingstone, London.

Burnet PW, Eastwood SL, Lacey K and Harrison PJ (1995) The distribution of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor mRNA in human brain. *Brain Research* 676:157-168.

Buznikov GA, Sakharova AV, Manukhin BN and Markova LN (1972) The role of neurohumours in early embryogenesis. IV. Fluorometric and histochemical study of serotonin in cleaving eggs and larvae of sea urchins. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 27:339-351.

Buznikov GA and Shmukler YB (1981) Possible role of "prenervous" neurotransmitters in cellular interactions of early embryogenesis: a hypothesis. *Neurochemical Research* 6:55-68.

Buznikov GA, Nikitina LA, Galanov AY, Malchenko LA and Trubnikova OB (1993) The control of oocyte maturation in the starfish and amphibians by serotonin and its antagonists. *International Journal of Developmental Biology* 37:363-364.

Buznikov GA, Shmukler YB and Lauder JM (1996) From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development. *Cellular & Molecular Neurobiology* 16:533-559.

Buznikov GA, Shmukler YB and Lauder JM (1999) Changes in the physiological roles of neurotransmitters during individual development. *Neuroscience & Behavioral Physiology* 29:11-21.

Buznikov GA, Lambert HW and Lauder JM (2001) Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell & Tissue Research* 305:177-186.

Byskov AG (1978) Follicular atresia, in *The Vertebrate Ovary: Comparative Biology and Evolution* (Jones RE ed) pp 533-562, Plenum, New York.

Byskov AG, Andersen CY, Nordholm L, Thogersen H, Xia G, Wassmann O, Andersen JV, Guddal E and Roed T (1995) Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. *Nature* 374:559-562.

Byskov AG, Yding AC, Hossaini A and Guoliang X (1997) Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH. *Molecular Reproduction & Development* 46:296-305.

Campos MB, Vitale ML, Calandra RS and Chiocchio SR (1990) Serotonergic innervation of the rat testis. *Journal of Reproduction & Fertility* 88:475-479.

Can A and Albertini DF (1997) M-phase specific centrosome-microtubule alterations induced by the fungicide MBC in human granulosa cells. *Mutation Research* 373:139-151.

Can A, Holmes R M and Albertini D F (1997) Analysis of the mammalian ovary by confocal microscopy, in *Microscopy of Reproduction and Development* (Motta PM ed) pp 101-108, Antonio Delfino Editore, Rome.

Canipari R, Pietrolucci A and Mangia F (1979) Increase of total protein synthesis during mouse oocyte growth. *Journal of Reproduction & Fertility* 57:405-413.

Canipari R, Epifano O, Siracusa G and Salustri A (1995) Mouse oocytes inhibit plasminogen activator production by ovarian cumulus and granulosa cells. *Developmental Biology* 167:371-378.

Carabatsos MJ, Elvin J, Matzuk MM and Albertini DF (1998) Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Developmental Biology* 204:373-384.

Carnegie JA (1990) Secretion of fibronectin by rat granulosa cells occurs primarily during early follicular development. *Journal of Reproduction & Fertility* 89:579-589.

Carson MJ, Thomas EA, Danielson PE and Sutcliffe JG (1996) The 5HT_{5A} serotonin receptor is expressed predominantly by astrocytes in which it inhibits cAMP accumulation: a mechanism for neuronal suppression of reactive astrocytes. *Glia* 17:317-326.

Cases O, Seif I, Grimsby J, Gaspar P, Chen K, Pournin S, Muller U, Aguet M, Babinet C and Shih JC (1995) Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science* 268:1763-1766.

Cerda J, Petrino TR, Lin YP and Wallace RA (1995) Inhibition of *Fundulus heteroclitus* oocyte maturation *in vitro* by serotonin (5-hydroxytryptamine). *Journal of experimental zoology* 273:224-233.

Cerda J, Petrino TR, Greenberg MJ and Wallace RA (1997) Pharmacology of the serotonergic inhibition of steroid-induced reinitiation of oocyte meiosis in the teleost *Fundulus heteroclitus*. *Molecular Reproduction & Development* 48:282-291.

Cerda J, Reich G, Wallace RA and Selman K (1998a) Serotonin inhibition of steroid-induced meiotic maturation in the teleost *Fundulus heteroclitus*: role of cyclic AMP and protein kinases. *Molecular Reproduction & Development* 49:333-341.

Cerda J, Subhedar N, Reich G, Wallace RA and Selman K (1998b) Oocyte sensitivity to serotonergic regulation during the follicular cycle of the teleost *Fundulus heteroclitus*. *Biology of Reproduction* 59:53-61.

Chambard JC, Obberghen-Schilling E, Haslam RJ, Vouret V and Pouyssegur J (1990) Chinese hamster serotonin (5-HT) type 2 receptor cDNA sequence. *Nucleic Acids Research* 18:5282.

Chambers CD, Johnson KA, Dick LM, Felix RJ and Jones KL (1996) Birth outcomes in pregnant women taking fluoxetine. *New England Journal of Medicine* 335:1010-1015.

Chang AS, Chang SM, Starnes DM, Schroeter S, Bauman AL and Blakely RD (1996) Cloning and expression of the mouse serotonin transporter. *Brain Research Molecular Brain Research* 43:185-192.

Choi DS, Ward SJ, Messaddeq N, Launay JM and Maroteaux L (1997) 5-HT_{2B} receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardiac cells. *Development* 124:1745-1755.

Christenson JG, Dairman W and Udenfriend S (1970) Preparation and properties of a homogeneous aromatic L-amino acid decarboxylase from hog kidney. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 141:356-367.

Claeysen S, Sebben M, Journot L, Bockaert J and Dumuis A (1996) Cloning, expression and pharmacology of the mouse 5-HT(4L) receptor. *FEBS Letters* 398:19-25.

Claeysen S, Faye P, Sebben M, Lemaire S, Bockaert J and Dumuis A (1997) Cloning and expression of human 5-HT4S receptors. Effect of receptor density on their coupling to adenylyl cyclase. *NeuroReport* 8:3189-3196.

Claeysen S, Sebben M, Becamel C, Bockaert J and Dumuis A (1999) Novel brain-specific 5-HT4 receptor splice variants show marked constitutive activity: role of the C-terminal intracellular domain. *Molecular Pharmacology* 55:910-920.

Clausell DE and Soliman KF (1978) Ovarian serotonin content in relation to ovulation. *Experientia* 34:410-411.

Colas P and Dube F (1998) Meiotic maturation in mollusc oocytes. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 9:539-548.

Colonna R and Mangia F (1983) Mechanisms of amino acid uptake in cumulus-enclosed mouse oocytes. *Biology of Reproduction* 28:797-803.

Compan V, Charnay Y, Dusticier N, Daszuta A, Hen R and Bockaert J (2004a) Feeding disorders in 5-HT4 receptor knockout mice. *Journal de la Société de Biologie* 198:37-49.

Compan V, Zhou M, Grailhe R, Gazzara RA, Martin R, Gingrich J, Dumuis A, Brunner D, Bockaert J and Hen R (2004b) Attenuated response to stress and novelty and hypersensitivity to seizures in 5-HT4 receptor knock-out mice. *Journal of Neuroscience* 24:412-419.

Conn PJ and Sanders-Bush E (1984) Selective 5HT-2 antagonists inhibit serotonin stimulated phosphatidylinositol metabolism in cerebral cortex. *Neuropharmacology* 23:993-996.

Conn PJ and Sanders-Bush E (1985) Serotonin-stimulated phosphoinositide turnover: mediation by the S2 binding site in rat cerebral cortex but not in subcortical regions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 234:195-203.

Conn PJ, Sanders-Bush E, Hoffman BJ and Hartig PR (1986) A unique serotonin receptor in choroid plexus is linked to phosphatidylinositol turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:4086-4088.

Contesse V, Hamel C, Delarue C, Lefebvre H and Vaudry H (1994) Effect of a series of 5-HT₄ receptor agonists and antagonists on steroid secretion by the adrenal gland in vitro. *European Journal of Pharmacology* 265:27-33.

Contesse V, Lenglet S, Grumolato L, Anouar Y, Lihmann I, Lefebvre H, Delarue C and Vaudry H (1999) Pharmacological and molecular characterization of 5-hydroxytryptamine(7) receptors in the rat adrenal gland. *Molecular Pharmacology* 56:552-561.

Contesse V, Lefebvre H, Lenglet S, Kuhn JM, Delarue C and Vaudry H (2000) Role of 5-HT in the regulation of the brain-pituitary-adrenal axis: effects of 5-HT on adrenocortical cells. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology* 78:967-983.

Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, Jin C and Tsafiri A (2002) Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular & Cellular Endocrinology* 187:153-159.

Cortvrindt R and Smitz J (2001) In vitro follicle growth: achievements in mammalian species. *Reproduction in Domestic Animals* 36:3-9.

Costall B and Naylor RJ (2004) 5-HT₃ receptors. *Current Drug Targets CNS Neurological Disorders* 3:27-37.

Côté F, Thevenot E, Fligny C, Fromes Y, Darmon M, Ripoche MA, Bayard, E, Hanoun N, Saurini F, Lechat P, Dandolo L, Hamon M, Mallet J and Vojdani G (2003) Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral

serotonin in cardiac function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:13525-13530.

Cox DA and Cohen ML (1996) 5-HT_{2B} receptor signaling in the rat stomach fundus: dependence on calcium influx, calcium release and protein kinase C. *Behavioral Brain Research* 73:289-292.

Cox LJ, Larman MG, Saunders CM, Hashimoto K, Swann K and Lai FA (2002) Sperm phospholipase C ζ from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca²⁺ oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction* 124:611-623.

Crawford CM, Nash WJ and Lucas JS (1986) Spawning induction, and larval and juvenile rearing of the giant clam, *Tridacna gigas*. *Aquaculture* 58:281-295.

Csaba G, Nemeth G, Juvancz I and Vargha P (1980) Receptor amplifying effect of serotonin and serotonin analogues in a protozoan (*Tetrahymena*) model system. *Acta Physiologica Academiae Scientiarum Hungarica* 56:411-416.

Csaba G and Ubornyak L (1981) Effects of hormones on the RNA-synthesis of *Tetrahymena pyriformis*. *Comparative Biochemistry & Physiology C* 68C:251-253.

Csaba G (1993) Presence in and effects of pineal indoleamines at very low level of phylogeny. *Experientia* 49:627-634.

Csaba Z, Csernus V and Gerendai I (1998) Intratesticular serotonin affects steroidogenesis in the rat testis. *Journal of Neuroendocrinology* 10:371-376.

Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG and Kirkness EF (1999) The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 397:359-363.

de Chaffoy dC, Leysen JE, De Clerck F, Van Belle H and Janssen PA (1985) Evidence that phospholipid turnover is the signal transducing system coupled to serotonin-S₂ receptor sites. *Journal of Biological Chemistry* 260:7603-7608.

Deanesly R (1972) Origins and development of interstitial tissue in ovaries of rabbit and guinea-pig. *Journal of Anatomy* 113:251-260.

Deguchi R and Osanai K (1995) Serotonin-induced meiosis reinitiation from the first prophase and from the first metaphase in oocytes of the marine bivalve *Hiatella flaccida*: respective changes in intracellular Ca^{2+} and pH. *Developmental Biology* 171:483-496.

Dekel N and Sherizly I (1985) Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. *Endocrinology* 116:406-409.

Delarue C, Leboulenger F, Morra M, Hery F, Verhofstad AJ, Berod A, Denoroy L, Pelletier G and Vaudry H (1988a) Immunohistochemical and biochemical evidence for the presence of serotonin in amphibian adrenal chromaffin cells. *Brain Research* 459:17-26.

Delarue C, Lefebvre H, Idres S, Leboulenger F, Homo-Delarche G, Lihrmann I, Feuilloley M and Vaudry H (1988b) Serotonin stimulates corticosteroid secretion by frog adrenocortical tissue in vitro. *Journal of Steroid Biochemistry* 29:519-525.

Delarue C, Becquet D, Idres S, Hery F and Vaudry H (1992) Serotonin synthesis in adrenochromaffin cells. *Neuroscience* 46:495-500.

Delarue C, Contesse V, Lenglet S, Sicard F, Perraudin V, Lefebvre H, Kodjo M, Leboulenger F, Yon L, Gallo-Payet N and Vaudry H (2001) Role of neurotransmitters and neuropeptides in the regulation of the adrenal cortex. *Reviews of Endocrine & Metabolic Disorders* 2:253-267.

Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC and Healy JI (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration. *Nature* 386:855-858.

Dolmetsch RE, Xu K and Lewis RS (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392:933-936.

Dominici P, Tancini B, Barra D and Voltattorni CB (1987) Purification and characterization of rat-liver 3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase. *European Journal of Biochemistry* 169:209-213.

Doree M and Hunt T (2002) From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *Journal of Cell Science* 115:2461-2464.

Dorrington JH and Armstrong DT (1979) Effects of FSH on gonadal functions. *Recent Progress in Hormone Research* 35:301-342.

Dorrington JH, Moon YS and Armstrong DT (1975) Estradiol-17 β biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats; stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 97:1328-1331.

Downs SM, Coleman DL, Ward-Bailey PF and Eppig JJ (1985) Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82:454-458.

Downs SM, Coleman DL and Eppig JJ (1986) Maintenance of murine oocyte meiotic arrest: uptake and metabolism of hypoxanthine and adenosine by cumulus cell-enclosed and denuded oocytes. *Developmental Biology* 117:174-183.

Downs SM and Utecht AM (1999) Metabolism of radiolabeled glucose by mouse oocytes and oocyte-cumulus cell complexes. *Biology of Reproduction* 60:1446-1452.

Dubé F (1996) Mechanisms of activation of surf clam (*Spisula solodissima*) oocytes. *Invertebrate Reproduction & Development* 30:23-28.

Dubé F and Eckberg WR (1997) Intracellular pH increase driven by an Na⁺/H⁺ exchanger upon activation of surf clam oocytes. *Developmental Biology* 190:41-54.

Dufau ML, Tinajero JC and Fabbri A (1993) Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. *FASEB Journal* 7:299-307.

Dupont G (1998) Link between fertilization-induced Ca^{2+} oscillations and relief from metaphase II arrest in mammalian eggs: a model based on calmodulin-dependent kinase II activation. *Biophysical Chemistry* 72:153-167.

Dupont G, McGuinness OM, Johnson MH, Berridge MJ and Borgese F (1996) Phospholipase C in mouse oocytes: characterization of beta and gamma isoforms and their possible involvement in sperm-induced Ca^{2+} spiking. *Biochemical Journal* 316:583-591.

Dwivedi Y and Pandey GN (1998) Quantitation of 5HT_{2A} receptor mRNA in human postmortem brain using competitive RT-PCR. *NeuroReport* 9:3761-3765.

Dyer CA, Erickson G F and Curtis L K (1985) Functional heterogeneity in the ability of high density lipoproteins to enhance gonadotropin-induced androgen production in cultured rat theca-interstitial cells, in *Lipoprotein and Cholesterol Metabolism in Steroidogenic Tissues* (Strauss JF and Menon KMJ eds) pp 141-146, Strickley, Philadelphia.

Eaton MJ, Gudehithlu KP, Quach T, Silvia CP, Hadjiconstantinou M and Neff NH (1993) Distribution of aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA in mouse brain by in situ hybridization histology. *Journal of Comparative Neurology* 337:640-654.

Echternkamp SE, Spicer LJ, Gregory KE, Canning SF and Hammond JM (1990) Concentrations of insulin-like growth factor-I in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biology of Reproduction* 43:8-14.

Edwards RG, Fowler RE, Gore-Langton RE, Gosden RG, Jones EC, Readhead C and Steptoe PC (1977) Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. *Journal of Reproduction & Fertility* 51:237-263.

Eglen RM, Swank SR, Walsh LK and Whiting RL (1990) Characterization of 5-HT₃ and 'atypical' 5-HT receptors mediating guinea-pig ileal contractions in vitro. *British Journal of Pharmacology* 101:513-520.

Eppig JJ, Ward-Bailey PF and Coleman DL (1985) Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biology of Reproduction* 33:1041-1049.

Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola F and Hirao Y (1997) Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biology of Reproduction* 56:976-984.

Eppig JJ, Pendola FL and Wigglesworth K (1998) Mouse oocytes suppress cAMP-induced expression of LH receptor mRNA by granulosa cells in vitro. *Molecular Reproduction & Development* 49:327-332.

Eppig JJ (2001) Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122:829-838.

Eppig JJ, Wigglesworth K and Pendola FL (2002) The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:2890-2894.

Eppig JJ, Viveiros M M, Marin Bivens C and De La Fuente R (2004) Regulation of mammalian oocyte maturation, in *The Ovary* (Leung PCK and Adashi EY eds) pp 113-129, Elsevier, Amsterdam.

Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA and Hofeditz C (1985) The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocrine Reviews* 6:371-399.

Erlander MG, Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Danielson PE, Racke M, Slone AL, Siegel BW, Foye PE, Cannon K and . (1993) Two members of a distinct subfamily of 5-hydroxytryptamine receptors differentially expressed in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:3452-3456.

Errico M, Crozier RA, Plummer MR and Cowen DS (2001) 5-HT(7) receptors activate the mitogen activated protein kinase extracellular signal related kinase in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 102:361-367.

Espey LL and Lipner H (1994) Ovulation, in *Physiology of Reproduction* (Knobil E and Neill J eds) pp 725-780, Raven Press, New York.

Essman EJ (1987) The serotonergic system in *Tetrahymena pyriformis*. *Ric Clin Lab* 17:77-82.

Faraj BA, Olkowski ZL and Jackson RT (1994) Expression of a high-affinity serotonin transporter in human lymphocytes. *International Journal of Immunopharmacology* 16:561-567.

Farkash Y, Timberg R and Orly J (1986) Preparation of antiserum to rat cytochrome P-450 cholesterol side chain cleavage, and its use for ultrastructural localization of the immunoreactive enzyme by protein A-gold technique. *Endocrinology* 118:1353-1365.

Felder CC, Kanterman RY, Ma AL and Axelrod J (1990) Serotonin stimulates phospholipase A2 and the release of arachidonic acid in hippocampal neurons by a type 2 serotonin receptor that is independent of inositolphospholipid hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:2187-2191.

Feng P, Catt KJ and Knecht M (1988) Transforming growth factor-beta stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *Endocrinology* 122:181-186.

Fink G, Sumner BE, Rosie R, Grace O and Quinn JP (1996) Estrogen control of central neurotransmission: effect on mood, mental state, and memory. *Cellular & Molecular Neurobiology* 16:325-344.

Fink G, Sumner BE, McQueen JK, Wilson H and Rosie R (1998) Sex steroid control of mood, mental state and memory. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology* 25:764-775.

Fissore RA, Pinto-Correia C and Robl JM (1995) Inositol trisphosphate-induced calcium release in the generation of calcium oscillations in bovine eggs. *Biology of Reproduction* 53:766-774.

Fitzpatrick PF (2003) Mechanism of aromatic amino acid hydroxylation. *Biochemistry* 42:14083-14091.

Florian JA and Watts SW (1998) Integration of mitogen-activated protein kinase kinase activation in vascular 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor signal transduction. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 284:346-355.

Foguet M, Hoyer D, Pardo LA, Parekh A, Kluxen FW, Kalkman HO, Stuhmer W and Lubbert H (1992a) Cloning and functional characterization of the rat stomach fundus serotonin receptor. *EMBO Journal* 11:3481-3487.

Foguet M, Nguyen H, Le H and Lubbert H (1992b) Structure of the mouse 5-HT_{1C}, 5-HT₂ and stomach fundus serotonin receptor genes. *NeuroReport* 3:345-348.

Fong PP, Deguchi R and Kyojuka K (1996) Serotonergic ligands induce spawning but not oocyte maturation in the bivalve *Macra chinensis* from central Japan. *Biological Bulletin* 191:27-32.

Fong PP, Duncan J and Ram JL (1994a) Inhibition and sex specific induction of spawning by serotonergic ligands in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Experientia* 50:506-509.

Fong PP, Kyojuka K, Abdelghani H, Hardege JD and Ram JL (1994b) In vivo and in vitro induction of germinal vesicle breakdown in a freshwater bivalve, the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Journal of Experimental Zoology* 269:467-474.

Fong PP, Philbert CM and Roberts BJ (2003) Putative serotonin reuptake inhibitor-induced spawning and parturition in freshwater bivalves is inhibited by mammalian 5-HT₂ receptor antagonists. *Journal of Experimental Zoology A Comparative and Experimental Biology* 298:67-72.

Fong PP, Wall DM and Ram JL (1993) Characterization of serotonin receptor in the regulation of spawning in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Journal of Experimental Zoology* 267:475-482.

Francken BJ, Josson K, Lijnen P, Jurzak M, Luyten WH and Leysen JE (2000) Human 5-hydroxytryptamine(5A) receptors activate coexpressed G(i) and G(o) proteins in *Spodoptera frugiperda* 9 cells. *Molecular Pharmacology* 57:1034-1044.

Frank MG, Stryker MP and Tecott LH (2002) Sleep and sleep homeostasis in mice lacking the 5-HT_{2c} receptor. *Neuropsychopharmacology* 27:869-873.

Frazer A and Hensler J G (1999) Serotonin, in *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* (Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK and Uhler MD eds) pp 263-292, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Rubio M, Ozu M, Lustig L and Calandra RS (1999) Serotonin in golden hamster testes: testicular levels, immunolocalization and role during sexual development and photoperiodic regression-recrudescence transition. *Neuroendocrinology* 69:299-308.

Frungieri MB, Zitta K, Pignataro OP, Gonzalez-Calvar SI and Calandra RS (2002) Interactions between testicular serotonergic, catecholaminergic, and corticotropin-releasing hormone systems modulating cAMP and testosterone production in the golden hamster. *Neuroendocrinology* 76:35-46.

Fryxell KJ (1995) The evolutionary divergence of neurotransmitter receptors and second-messenger pathways. *Journal of Molecular Evolution* 41:85-97.

Fujiwara T, Nakada K, Shirakawa H and Miyazaki S (1993) Development of inositol trisphosphate-induced calcium release mechanism during maturation of hamster oocytes. *Developmental Biology* 156:69-79.

Gaddum JH and Picarelli ZP (1957) Two kinds of tryptamine receptor. *British Journal of Pharmacology* 12:323-328.

Gardner RL, Lyon MF, Evans EP and Burtenshaw MD (1985) Clonal analysis of X-chromosome inactivation and the origin of the germ line in the mouse embryo. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 88:349-363.

Gerald C, Adham N, Kao HT, Olsen MA, Laz TM, Schechter LE, Bard JA, Vaysse PJ, Hartig PR, Branchek TA and . (1995) The 5-HT₄ receptor: molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variants. *EMBO Journal* 14:2806-2815.

Gershon MD (2003) Plasticity in serotonin control mechanisms in the gut. *Current Opinion in Pharmacology* 3:600-607.

Gibbons MC and Castagna M (1984) Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. *Aquaculture* 40:189-191.

Gilchrist RB, Ritter LJ and Armstrong DT (2001) Mouse oocyte mitogenic activity is developmentally coordinated throughout folliculogenesis and meiotic maturation. *Developmental Biology* 240:289-298.

Gilchrist RB, Ritter LJ and Armstrong DT (2004) Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science* 82-83:431-446.

Gilula NB, Epstein ML and Beers WH (1978) Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *Journal of Cell Biology* 78:58-75.

Ginsburg M, Snow MH and McLaren A (1990) Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110:521-528.

Glennon RA, Raghupathi R, Bartyzel P, Teitler M and Leonhardt S (1992) Binding of phenylalkylamine derivatives at 5-HT_{1C} and 5-HT₂ serotonin receptors: evidence for a lack of selectivity. *Journal of Medicinal Chemistry* 35:734-740.

Glennon RA, Lee M, Rangisetty JB, Dukat M, Roth BL, Savage JE, McBride A, Rauser L, Hufeisen S and Lee DK (2000) 2-Substituted tryptamines: agents with selectivity for 5-HT₆ serotonin receptors. *Journal of Medicinal Chemistry* 43:1011-1018.

Gobet I, Durocher Y, Leclerc C, Moreau M and Guerrier P (1994) Reception and transduction of the serotonin signal responsible for meiosis reinitiation in oocytes of the Japanese clam *Ruditapes philippinarum*. *Developmental Biology* 164:540-549.

- Goppelt-Struebe M and Stroebel M (1998) Signaling pathways mediating induction of the early response genes prostaglandin G/H synthase-2 and egr-1 by serotonin via 5-HT_{2A} receptors. *Journal of Cellular Physiology* 175:341-347.
- Gordo AC, Wu H, He CL and Fissore RA (2000) Injection of sperm cytosolic factor into mouse metaphase II oocytes induces different developmental fates according to the frequency of [Ca²⁺]_i oscillations and oocyte age. *Biology of Reproduction* 62:1370-1379.
- Gore-Langton RE and Dorrington JH (1981) FSH induction of aromatase in cultured rat granulosa cells measured by a radiometric assay. *Molecular & Cellular Endocrinology* 22:135-151.
- Gore-Langton RE and Armstrong D G (1994) Follicular steroidogenesis and its control, in *The Physiology of Reproduction* (Knobil E and Neill J eds) pp 571-628, Raven Press, New York.
- Graf S and Sarna SK (1996) 5-HT-induced jejunal motor activity: enteric locus of action and receptor subtypes. *American Journal of Physiology* 270:G992-1000.
- Grailhe R, Grabtree GW and Hen R (2001) Human 5-HT(5) receptors: the 5-HT(5A) receptor is functional but the 5-HT(5B) receptor was lost during mammalian evolution. *European Journal of Pharmacology* 418:157-167.
- Graveleau C, Paust HJ, Schmidt-Grimminger D and Mukhopadhyay AK (2000) Presence of a 5-HT₇ receptor positively coupled to adenylate cyclase activation in human granulosa-lutein cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85:1277-1286.
- Greenwald GS and Roy S K (1994) Follicular development and its control, in *The Physiology of Reproduction* (Knobil E and Neill J eds) pp 629-724, Raven Press, New York.

- Grimsby J, Toth M, Chen K, Kumazawa T, Klaidman L, Adams JD, Karoum F, Gal J and Shih JC (1997) Increased stress response and beta-phenylethylamine in MAOB-deficient mice. *Nature Genetics* 17:206-210.
- Grosse J, Bulling A, Brucker C, Berg U, Amsterdam A, Mayerhofer A and Gratzl M (2000) Synaptosome-associated protein of 25 kilodaltons in oocytes and steroid-producing cells of rat and human ovary: molecular analysis and regulation by gonadotropins. *Biology of Reproduction* 63:643-650.
- Gude WD, Cosgrove G E and Hirsch G E (1982) *Histological Atlas of the Laboratory Mouse*. Plenum, New York.
- Guillet-Deniau I, Burnol AF and Girard J (1997) Identification and localization of a skeletal muscle secrotonin 5-HT_{2A} receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *Journal of Biological Chemistry* 272:14825-14829.
- Guptan P, Dhingra A and Panicker MM (1997) Multiple transcripts encode the 5-HT_{1F} receptor in rodent brain. *NeuroReport* 8:3317-3321.
- Guraya SS and Greenwald GS (1964) A comparative histochemical study of interstitial tissue and follicular atresia in the mammalian ovary. *Anatomical Record* 149:411-433.
- Guscott MR, Egan E, Cook GP, Stanton JA, Beer MS, Rosahl TW, Hartmann S, Kulagowski J, McAllister G, Fone KC and Hutson PH (2003) The hypothermic effect of 5-CT in mice is mediated through the 5-HT₇ receptor. *Neuropharmacology* 44:1031-1037.
- Haase J, Killian AM, Magnani F and Williams C (2001) Regulation of the serotonin transporter by interacting proteins. *Biochemical Society Transactions* 29:722-728.
- Haider SG (2004) Cell biology of Leydig cells in the testis. *International Review of Cytology* 233:181-241.
- Hamberger L, Hillensjo T and Ahren K (1978) Steroidogenesis in isolated cells of preovulatory rat follicles. *Endocrinology* 103:771-777.

Hamblin MW, Guthrie CR, Kohen R and Heidmann DE (1998) Gs protein-coupled serotonin receptors: receptor isoforms and functional differences. *Annals of the New York Academy of Sciences* 861:31-37.

Hamon M, Bourgoin S, Hery F and Simonnet G (1978) Activation of tryptophan hydroxylase by adenosine triphosphate, magnesium, and calcium. *Molecular Pharmacology* 14:99-110.

Hanng R, Tait SA and Tait JF (1970) In vitro effects of ACTH, angiotensins, serotonin and potassium on steroid output and conversion of corticosterone to aldosterone by isolated adrenal cells. *Endocrinology* 87:1147-1167.

Hanocq-Quetier J and Baltus E (1981) Induction of meiosis of *Xenopus laevis* oocytes by mianserine. *Gamete Research* 4:49-56.

Harris BZ and Lim WA (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. [Review] [104 refs]. *Journal of Cell Science* 114:3219-3231.

Hedlund PB, Danielson PE, Thomas EA, Slanina K, Carson MJ, Sutcliffe and JG. (2003) No hypothermic response to serotonin in 5-HT₇ receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:1375-1380.

Hedlund PB, Kelly L, Mazur C, Lovenberg T, Sutcliffe JG and Bonaventure P (2004) 8-OH-DPAT acts on both 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors to induce hypothermia in rodents. *European Journal of Pharmacology* 487:125-132.

Hegde SS and Eglen RM (1996) Peripheral 5-HT₄ receptors. *FASEB Journal* 10:1398-1407.

Heidmann DE, Metcalf MA, Kohen R and Hamblin MW (1997) Four 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization. *Journal of Neurochemistry* 1372-1381.

Heidmann DE, Szot P, Kohen R and Hamblin MW (1998) Function and distribution of three rat 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms produced by alternative splicing. *Neuropharmacology* 37:1621-1632.

Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH and Tecott LH (1998) Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:15049-15054.

Heller DT and Schultz RM (1980) Ribonucleoside metabolism by mouse oocytes: metabolic cooperativity between the fully grown oocyte and cumulus cells. *Journal of Experimental Zoology* 214:355-364.

Heller DT, Cahill DM and Schultz RM (1981) Biochemical studies of mammalian oogenesis: Metabolic cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes. *Developmental Biology* 84:455-464.

Henderson KM, Kieboom LE, McNatty KP, Lun S and Heath DA (1984) [125I]hCG binding to bovine thecal tissue from healthy and atretic antral follicles. *Molecular & Cellular Endocrinology* 34:91-98.

Hertig AT and Adams EC (1967) Studies on the human oocyte and its follicle. I. Ultrastructural and histochemical observations on the primordial follicle stage. *Journal of Cell Biology* 34:647-675.

Hickey TE, Marrocco DL, Gilchrist RB, Norman RJ and Armstrong DT (2004) Interactions between androgen and growth factors in granulosa cell subtypes of porcine antral follicles. *Biology of Reproduction* 71:45-52.

Hillensjo T, Magnusson C, Svensson U and Thelander H (1981) Effect of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone on progesterone synthesis by cultured rat cumulus cells. *Endocrinology* 108:1920-1924.

Hillier SG, Zeleznik AJ and Ross GT (1978) Independence of steroidogenic capacity and luteinizing hormone receptor induction in developing granulosa cells. *Endocrinology* 102:937-946.

Hinson JP, Vinson GP, Pudney J and Whitehouse BJ (1989) Adrenal mast cells modulate vascular and secretory responses in the intact adrenal gland of the rat. *Journal of Endocrinology* 121:253-260.

Hirai S, Kishimoto T, Kadam AL, Kanatani H and Koide SS (1988) Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. *Journal of Experimental Zoology* 245:318-321.

Hirshfield AN (1986) Patterns of [3H] thymidine incorporation differ in immature rats and mature, cycling rats. *Biology of Reproduction* 34:229-235.

Hirst WD, Price GW, Rattray M and Wilkin GP (1997) Identification of 5-hydroxytryptamine receptors positively coupled to adenylyl cyclase in rat cultured astrocytes. *British Journal of Pharmacology* 120:509-515.

Hoffman BJ, Mezey E and Brownstein MJ (1991) Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. *Science* 254:579-580.

Hogan B, Beddington R, Costantini F and Lacy E (1994) *Manipulating the Mouse Embryo*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Holzwarth MA and Brownfield MS (1985) Serotonin coexists with epinephrine in rat adrenal medullary cells. *Neuroendocrinology* 41:230-236.

Horner K, Livera G, Hinckley M, Trinh K, Storm D and Conti M (2003) Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. *Developmental Biology* 258:385-396.

Hranilovic D, Lesch KP, Ugarkovic D, Cicin-Sain L and Jernej B (1996) Identification of serotonin transporter mRNA in rat platelets. *Journal of Neural Transmission* 103:957-965.

Igusa Y and Miyazaki S (1983) Effects of altered extracellular and intracellular calcium concentration on hyperpolarizing responses of the hamster egg. *Journal of Physiology* 340:611-632.

Il'kova G, Rehak P, Vesela J, Cikos S, Fabian D, Czikkova S and Koppel J (2004) Serotonin localization and its functional significance during mouse preimplantation embryo development. *Zygote* 12:205-213.

Imada-Shirakata Y, Kotera T, Ueda S and Okuma M (1997) Serotonin activates electrolyte transport via 5-HT_{2A} receptor in rat colonic crypt cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 230:437-441.

Inoue M, Kitazawa T, Cao J and Taneike T (2003) 5-HT₇ receptor-mediated relaxation of the oviduct in nonpregnant proestrus pigs. *European Journal of Pharmacology* 461:207-218.

Isobe T, Ichimura T, Sunaya T, Okuyama T, Takahashi N, Kuwano R and Takahashi Y (1991) Distinct forms of the protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Journal of Molecular Biology* 217:125-132.

Jaffe LF (1991) The path of calcium in cytosolic calcium oscillations: a unifying hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 88:9883-9887.

Jasper JR, Kosaka A, To ZP, Chang DJ and Eglen RM (1997) Cloning, expression and pharmacology of a truncated splice variant of the human 5-HT₇ receptor (h5-HT_{7b}). *British Journal of Pharmacology* 122:126-132.

Jiang GC, Yohrling GJ, Schmitt JD and Vrana KE (2000) Identification of substrate orienting and phosphorylation sites within tryptophan hydroxylase using homology-based molecular modeling. *Journal of Molecular Biology* 302:1005-1017.

Jones KT, Carroll J and Whittingham DG (1995) Ionomycin, thapsigargin, ryanodine, and sperm induced Ca²⁺ release increase during meiotic maturation of mouse oocytes. *Journal of Biological Chemistry* 270:6671-6677.

Jones KT, Soeller C and Cannell MB (1998) The passage of Ca^{2+} and fluorescent markers between the sperm and egg after fusion in the mouse. *Development* 125:4627-4635.

Jones PB and Hsueh AJ (1982) Pregnenolone biosynthesis by cultured rat granulosa cells: modulation by follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 111:713-721.

Joyce IM, Pendola FL, O'Brien M and Eppig JJ (2001) Regulation of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 messenger ribonucleic acid expression in mouse granulosa cells during ovulation. *Endocrinology* 142:3187-3197.

Juengel JL and McNatty KP (2005) The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Human Reproduction Update* 11:143-160.

Julius D, MacDermott AB, Axel R and Jessell TM (1988) Molecular characterization of a functional cDNA encoding the serotonin 1c receptor. *Science* 241:558-564.

Julius D, Huang KN, Livelli TJ, Axel R and Jessell TM (1990) The 5HT₂ receptor defines a family of structurally distinct but functionally conserved serotonin receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:928-932.

Juneja R, Segal SJ and Koide SS (1993) Promotion of fertilizability of *Spisula* oocytes with 5-hydroxytryptamine. *Invertebrate Reproduction & Development* 24:103-106.

Juneja R, Ito E and Koide SS (1994) Effect of serotonin and tricyclic antidepressants on intracellular calcium concentrations in *Spisula* oocytes. *Cell Calcium* 15:1-6.

Kalinowski RR, Berlot CH, Jones TL, Ross LF, Jaffe LA and Mehlmann LM (2004) Maintenance of meiotic prophase arrest in vertebrate oocytes by a Gs protein-mediated pathway. *Developmental Biology* 267:1-13.

Kamat BR, Brown LF, Manseau EJ, Senger DR and Dvorak HF (1995) Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *American Journal of Pathology* 146:157-165.

Karlsson C, Bodelsson G, Bodelsson M and Stjernquist M (1997) 5-Hydroxytryptamine contracts human uterine artery smooth muscle predominantly via 5-HT₂ receptors. *Human Reproduction* 12:361-367.

Kidder GM and Mhawi AA (2002) Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction* 123:613-620.

Kirchgessner AL, Liu MT, Raymond JR and Gershon MD (1996) Identification of cells that express 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors in the nervous systems of the bowel and pancreas. *Journal of Comparative Neurology* 364:439-455.

Kline D and Kline JT (1992) Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Developmental Biology* 149:80-89.

Knott JG, Kurokawa M, Fissore RA, Schultz RM and Williams CJ (2005) Transgenic RNA Interference Reveals Role for Mouse Sperm Phospholipase C_ζ in Triggering Ca²⁺ Oscillations During Fertilization. *Biology of Reproduction* 72:992-996.

Kohen R, Metcalf MA, Khan N, Druck T, Huebner K, Lachowicz JE, Meltzer HY, Sibley DR, Roth BL and Hamblin MW (1996) Cloning, characterization, and chromosomal localization of a human 5-HT₆ serotonin receptor. *Journal of Neurochemistry* 66:47-56.

Kohen R, Fashingbauer LA, Heidmann DE, Guthrie CR and Hamblin MW (2001) Cloning of the mouse 5-HT₆ serotonin receptor and mutagenesis studies of the third cytoplasmic loop. *Brain Research Molecular Brain Research* 90:110-117.

Kono T, Carroll J, Swann K and Whittingham DG (1995) Nuclei from fertilized mouse embryos have calcium-releasing activity. *Development* 121:1123-1128.

Koppan M, Bodis J, Verzar Z, Tinneberg HR and Torok A (2004) Serotonin may alter the pattern of gonadotropin-induced progesterone release of human granulosa cells in superfusion system. *Endocrine* 24:155-159.

Kouchi Z, Fukami K, Shikano T, Oda S, Nakamura Y, Takenawa T and Miyazaki S (2004) Recombinant phospholipase C ζ has high Ca²⁺ sensitivity and induces Ca²⁺ oscillations in mouse eggs. *Journal of Biological Chemistry* 279:10408-10412.

Krantic S, Dube F, Quirion R and Guerrier P (1991) Pharmacology of the serotonin-induced meiosis reinitiation in *Spisula solidissima* oocytes. *Developmental Biology* 146:491-498.

Krantic S, Guerrier P and Dube F (1993) Meiosis reinitiation in surf clam oocytes is mediated via a 5-hydroxytryptamine₅ serotonin membrane receptor and a vitelline envelope-associated high affinity binding site. *Journal of Biological Chemistry* 268:7983-7989.

Krobert KA, Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM and Levy FO (2001) The cloned human 5-HT₇ receptor splice variants: a comparative characterization of their pharmacology, function and distribution. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 363:620-632.

Krobert KA and Levy FO (2002) The human 5-HT₇ serotonin receptor splice variants: constitutive activity and inverse agonist effects. *British Journal of Pharmacology* 135:1563-1571.

Kuhn DM, Arthur R and States JC (1997) Phosphorylation and activation of brain tryptophan hydroxylase: identification of serine-58 as a substrate site for protein kinase A. *Journal of Neurochemistry* 68:2220-2223.

Kumar NM and Gilula NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-388.

Kuroda H, Terada N, Nakayama H, Matsumoto K and Kitamura Y (1988) Infertility due to growth arrest of ovarian follicles in Sl/Sl mice. *Developmental Biology* 126:71-79.

Kursar JD, Nelson DL, Wainscott DB and Baez M (1994) Molecular cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the human 5-hydroxytryptamine_{2B} receptor. *Molecular Pharmacology* 46:227-234.

Kurscheid-Reich D, Throckmorton DC and Rasmussen H (1995) Serotonin activates phospholipase D in rat mesangial cells. *American Journal of Physiology* 268:F997-1003.

Kyozuka K, Deguchi R, Yoshida N and Yamashita M (1997) Change in intracellular Ca²⁺ is not involved in serotonin-induced meiosis reinitiation from the first prophase in oocytes of the marine bivalve *Crassostrea gigas*. *Developmental Biology* 182:33-41.

Lam X, Gieseke C, Knoll M and Talbot P (2000) Assay and importance of adhesive interaction between hamster (*Mesocricetus auratus*) oocyte-cumulus complexes and the oviductal epithelium. *Biology of Reproduction* 62:579-588.

Landau MA, Buznikov GA, Kabankin AS, Teplits NA and Chernilovskaya PE (1981) Sensitivity of sea urchin embryos to cytotoxic neuropharmacological drugs, the correlations between activity and lipophilicity of indole and benzole derivatives. *Comparative Biochemistry & Physiology - C: Comparative Pharmacology & Toxicology* 69:359-366.

Lanfumeey L and Hamon M (2004) 5-HT₁ receptors. *Current Drug Targets CNS & Neurological Disorders* 3:1-10.

Langlois M and Fischmeister R (2003) 5-HT₄ receptor ligands: applications and new prospects. *Journal of Medicinal Chemistry* 46:319-344.

Lanuza GM, Fischman ML and Baranao JL (1998) Growth promoting activity of oocytes on granulosa cells is decreased upon meiotic maturation. *Developmental Biology* 197:129-139.

LaRosa C and Downs SM (2005) MEK inhibitors block AICAR-induced maturation in mouse oocytes by a MAPK-independent mechanism. *Molecular Reproduction and Development* 70:235-245.

Lauder JM (1988) Neurotransmitters as morphogens. *Progress in Brain Research* 73:365-387.

Lauder JM, Tamir H and Sadler TW (1988) Serotonin and morphogenesis. I. Sites of serotonin uptake and -binding protein immunoreactivity in the midgestation mouse embryo. *Development* 102:709-720.

Lawrence TS, Dekel N and Beers WH (1980) Binding of human chorionic gonadotropin by rat cumuli oophori and granulosa cells: a comparative study. *Endocrinology* 106:1114-1118.

Lawrence Y, Whitaker M and Swann K (1997) Sperm-egg fusion is the prelude to the initial Ca^{2+} increase at fertilization in the mouse. *Development* 124:233-241.

Lawrence Y, Ozil JP and Swann K (1998) The effects of a Ca^{2+} chelator and heavy-metal-ion chelators upon Ca^{2+} oscillations and activation at fertilization in mouse eggs suggest a role for repetitive Ca^{2+} increases. *Biochemical Journal* 335:335-342.

Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Feuilloley M, Hery F, Grise P, Raynaud G, Verhofstad AA, Wolf LM and Vaudry H (1992) Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin₄ receptor subtype. *Neuroscience* 47:999-1007.

Lefebvre H, Compagnon P, Contesse V, Delarue C, Thuillez C, Vaudry H and Kuhn JM (2001) Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal cortex: paracrine stimulation of aldosterone secretion by 5-HT. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86:5001-5007.

Legay C, Faudon M, Hery F and Ternaux JP (1983) 5-HT metabolism in the intestinal wall of the rat--I. The mucosa. *Neurochemistry International* 5:721-727.

Lenglet S, Louiset E, Delarue C, Vaudry H and Contesse V (2002) Activation of 5-HT₇ receptor in rat glomerulosa cells is associated with an increase in adenylyl cyclase activity and calcium influx through T-type calcium channels. *Endocrinology* 143:1748-1760.

Leung PC and Steele GL (1992) Intracellular signaling in the gonads. *Endocrine Reviews* 13:476-498.

Leysen JE (2004) 5-HT₂ receptors. *Current Drug Targets CNS Neurological Disorders* 3:11-26.

Li S, Maruo T, Ladines-Llave CA, Samoto T, Kondo H and Mochizuki M (1994) Expression of transforming growth factor- α in the human ovary during follicular growth, regression and atresia. *Endocrine Journal* 41:693-701.

Li XM, Juorio AV, Paterson IA, Walz W, Zhu MY and Boulton AA (1992) Gene expression of aromatic L-amino acid decarboxylase in cultured rat glial cells. *Journal of Neurochemistry* 59:1172-1175.

Lindstrom P and Sehlin J (1983) Mechanisms underlying the effects of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan in pancreatic islets. A proposed role for L-aromatic amino acid decarboxylase. *Endocrinology* 112:1524-1529.

Liu H, Irving HR and Coupar IM (2001) Expression patterns of 5-HT₇ receptor isoforms in the rat digestive tract. *Life Science* 69:2467-2475.

Lopez-Gimenez JF, Mengod G, Palacios JM and Vilaro MT (2001) Regional distribution and cellular localization of 5-HT_{2C} receptor mRNA in monkey brain: comparison with [3H]mesulergine binding sites and choline acetyltransferase mRNA. *Synapse* 42:12-26.

Loric S, Launay JM, Colas JF and Maroteaux L (1992) New mouse 5-HT₂-like receptor. Expression in brain, heart and intestine. *FEBS Letters* 312:203-207.

Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Miller JD, Prosser RA, Rea MA, Foye PE, Racke M, Slone AL and Siegel BW (1993) A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron* 11:449-458.

- Lovenberg W, Jequier E and Sjoerdsma A (1967) Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science* 155:217-219.
- Lunenfeld B, Kraiem Z and Eshkol A (1975) The function of the growing follicle. *Journal of Reproduction & Fertility* 45:567-574.
- Mackintosh C (2004) Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochemical Journal* 381:329-342.
- Magoffin DA and Erickson GF (1982) Primary culture of differentiating ovarian androgen-producing cells in defined medium. *Journal of Biological Chemistry* 257:4507-4513.
- Mahi-Brown CA and Yanagimachi R (1983) Parameters influencing ovum pickup by the oviductal fimbria in the golden hamster. *Gamete Research* 8:1-10.
- Marangos P, Fitzharris G and Carroll J (2003) Ca²⁺ oscillations at fertilization in mammals are regulated by the formation of pronuclei. *Development* 130:1461-1472.
- Marcos E, Fadel E, Sanchez O, Humbert M, Darteville P, Simonneau G, Hamon M, Adnot S and Eddahibi S (2004) Serotonin-induced smooth muscle hyperplasia in various forms of human pulmonary hypertension. *Circulation Research* 94:1263-1270.
- Maroteaux L, Saudou F, Amlaiky N, Boschert U, Plassat JL and Hen R (1992) Mouse 5HT_{1B} serotonin receptor: cloning, functional expression, and localization in motor control centers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:3020-3024.
- Martin TR, Cohen ML and Drazen JM (1994) Serotonin-induced pulmonary responses are mediated by the 5-HT₂ receptor in the mouse. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 268:104-109.
- Martinez A, Knappskog PM and Haavik J (2001) A structural approach into human tryptophan hydroxylase and its implications for the regulation of serotonin biosynthesis. *Current Medicinal Chemistry* 8:1077-1091.

Mason HD, Willis DS, Holly JM and Franks S (1994) Insulin preincubation enhances insulin-like growth factor-II (IGF-II) action on steroidogenesis in human granulosa cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 78:1265-1267.

Masseau I, Bannon P, Anctil M and Dube F (2002) Localization and quantification of gonad serotonin during gametogenesis of the surf clam, *Spisula solidissima*. *Biological Bulletin* 202:23-33.

Matsutani T and Nomura T (1982) Induction of spawning by serotonin in the scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay). *Marine Biology Letters* 3:353-358.

Matsutani T and Nomura T (1986) Serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and gonad of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Cell & Tissue Research* 244:515-517.

Matsutani T and Nomura T (1987) In vitro effects of serotonin and prostaglandins on release of eggs from the ovary of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *General & Comparative Endocrinology* 67:111-118.

Matthes H, Boschert U, Amlaiky N, Grailhe R, Plassat JL, Muscatelli F, Mattei MG and Hen R (1993) Mouse 5-hydroxytryptamine_{5A} and 5-hydroxytryptamine_{5B} receptors define a new family of serotonin receptors: cloning, functional expression, and chromosomal localization. *Molecular Pharmacology* 43:313-319.

Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM and Eppig JJ (2002a) Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296:2178-2180.

Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM and Eppig JJ (2002b) Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296:2178-2180.

Mayer SE and Sanders-Bush E (1994) 5-Hydroxytryptamine type 2A and 2C receptors linked to Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransport. *Molecular Pharmacology* 45:991-996.

Mayerhofer A, Smith GD, Danilchik M, Levine JE, Wolf DP, Dissen GA and Ojeda SR (1998) Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: evidence for a cell-cell regulatory loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:10990-10995.

Mayerhofer A, Dimitrijevic N and Kunz L (2003) The expression and biological role of the non-neuronal cholinergic system in the ovary. *Life Sciences* 72:2039-2045.

McGuinness OM, Moreton RB, Johnson MH and Berridge MJ (1996) A direct measurement of increased divalent cation influx in fertilised mouse oocytes. *Development* 122:2199-2106.

McNatty KP, Makris A, DeGrazia C, Osathanondh R and Ryan KJ (1979) The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 49:687-699.

Mehlmann LM, Terasaki M, Jaffe LA and Kline D (1995) Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology* 170:607-615.

Mehlmann LM, Carpenter G, Rhee SG and Jaffe LA (1998) SH2 domain-mediated activation of phospholipase Cgamma is not required to initiate Ca²⁺ release at fertilization of mouse eggs. *Developmental Biology* 203:221-232.

Mehlmann LM, Jones TL and Jaffe LA (2002) Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science* 297:1343-1345.

Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, Brennan TJ, Evsikov AV, Pendola FL, Knowles BB, Eppig JJ and Jaffe LA (2004) The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science* 306:1947-1950.

Mengod G, Nguyen H, Le H, Waeber C, Lubbert H and Palacios JM (1990) The distribution and cellular localization of the serotonin 1C receptor mRNA in the rodent

brain examined by in situ hybridization histochemistry. Comparison with receptor binding distribution. *Neuroscience* 35:577-591.

Merchant H (1975) Rat gonadal and ovarioan organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Developmental Biology* 44:1-21.

Merchant-Larios H and Centeno B (1981) Morphogenesis of the ovary from the sterile W/W^v mouse. *Progress in Clinical and Biological Research* 59B:383-392.

Mialet J, Berque-Bestel I, Eftekhari P, Gastineau M, Giner M, Dahmoune Y, Donzeau-Gouge P, Hoebeke J, Langlois M, Sicsic S, Fischmeister R and Lezoualc'h F (2000a) Isolation of the serotonergic 5-HT₄(e) receptor from human heart and comparative analysis of its pharmacological profile in C6-glia and CHO cell lines. *British Journal of Pharmacology* 129:771-781.

Mialet J, Berque-Bestel I, Sicsic S, Langlois M, Fischmeister R and Lezoualc'h F (2000b) Pharmacological characterization of the human 5-HT₄(d) receptor splice variant stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *British Journal of Pharmacology* 131:827-835.

Miyake A, Mochizuki S, Takemoto Y and Akuzawa S (1995) Molecular cloning of human 5-hydroxytryptamine₃ receptor: heterogeneity in distribution and function among species. *Molecular Pharmacology* 48:407-416.

Miyazaki S, Hashimoto N, Yoshimoto Y, Kishimoto T, Igusa Y and Hiramoto Y (1986) Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilization of golden hamster eggs. *Developmental Biology* 118:259-267.

Miyazaki S, Katayama Y and Swann K (1990) Synergistic activation by serotonin and GTP analogue and inhibition by phorbol ester of cyclic Ca²⁺ rises in hamster eggs. *Journal of Physiology (London)* 426:209-227.

Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K and Honda Y (1993) Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ release channel in Ca²⁺ waves and Ca²⁺ oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Developmental Biology* 158:62-78.

Mockus SM and Vrana KE (1998) Advances in the molecular characterization of tryptophan hydroxylase. *Journal of Molecular Neuroscience* 10:163-179.

Moiseiwitsch JD (2000) The role of serotonin and neurotransmitters during craniofacial development. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 11:230-239.

Moiseiwitsch JR and Lauder JM (1995) Serotonin regulates mouse cranial neural crest migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:7182-7186.

Molineaux SM, Jessell TM, Axel R and Julius D (1989) 5-HT_{1c} receptor is a prominent serotonin receptor subtype in the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:6793-6797.

Monsma FJ, Jr., Shen Y, Ward RP, Hamblin MW and Sibley DR (1993) Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. *Molecular Pharmacology* 43:320-327.

Montag M, van der Ven K, Dorbecker C and van der Ven H (1999) Characterization of testicular mouse glucosamine 6-phosphate deaminase (GNPDA). *FEBS Letters* 458:141-144.

Moon YS and Duleba AJ (1982) Comparative studies of androgen metabolism in theca and granulosa cells of human follicles in vitro. *Steroids* 39:419-430.

Moore GD, Ayabe T, Visconti PE, Schultz RM and Kopf GS (1994) Roles of heterotrimeric and monomeric G proteins in sperm-induced activation of mouse eggs. *Development* 120:3313-3323.

Moore GP, Lintern-Moore S, Peters H and Faber M (1974) RNA synthesis in the mouse oocyte. *Journal of Cell Biology* 60:416-422.

Motta PM, Makabe S, Naguro T and Correr S (1994) Oocyte follicle cells association during development of human ovarian follicle. A study by high resolution scanning and transmission electron microscopy. *Archives of Histology and Cytology* 57:369-394.

Muneoka KT and Takigawa M (2003) 5-Hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor immunoreactivity-positive 'stigmoid body'-like structure in developing rat brains. *International Journal of Developmental Neuroscience* 21:133-143.

Murphy DL, Wichems C, Li Q and Heils A (1999) Molecular manipulations as tools for enhancing our understanding of 5-HT neurotransmission. *Trends in Pharmacological Sciences* 20:246-252.

Nakaki T, Roth BL, Chuang DM and Costa E (1985) Phasic and tonic components in 5-HT₂ receptor-mediated rat aorta contraction: participation of Ca⁺⁺ channels and phospholipase C. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 234:442-446.

Nayudu PL and Osborn SM (1992) Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. *Journal of Reproduction & Fertility* 95:349-362.

Nebigil CG, Choi DS, Dierich A, Hickel P, Le Meur M, Messaddeq N, Launay JM and Maroteaux L (2000) Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:9508-9513.

Neilson L, Andalibi A, Kang D, Coutifaris C, Strauss JF, Stanton JL and Green DL (2000) Molecular phenotype of the human oocyte by PCR-SAGE. *Genomics* 13-24.

Nelson CS, Cone RD, Robbins LS, Allen CN and Adelman JP (1995) Cloning and expression of a 5HT₇ receptor from *Xenopus laevis*. *Receptors & Channels* 3:61-70.

Nelson DL (2004) 5-HT₅ receptors. *Current Drug Targets CNS & Neurological Disorders* 3:53-58.

Neumaier JF, Sexton TJ, Yracheta J, Diaz AM and Brownfield M (2001) Localization of 5-HT(7) receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 21:63-73.

Niesler B, Frank B, Kapeller J and Rappold GA (2003) Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT₃ serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. *Gene* 310:101-111.

Nikitina LA and Buznikov GA (1996) [Serotonin inhibits phorbol ester-induced oocyte maturation in the green toad (*Bufo viridis*)]. *Ontogenez* 27:122-125.

Nikitina LA, Mal'chenko LA, Teplits NA and Buznikov GA (1988) [The action of serotonin and its analogs on the in vitro maturation of amphibian oocytes]. *Ontogenez* 19:499-507.

Nikitina LA, Trubnikova OB and Buznikov GA (1993) [The action of neurotransmitters and their antagonists on oocyte maturation. The action of serotonin antagonists on the in-vitro maturation of amphibian oocytes]. *Ontogenez* 24:29-38.

Nimrod A, Rosenfield RL and Otto P (1980) Relationship of androgen action to androgen metabolism in isolated rat granulosa cells. *Journal of Steroid Biochemistry* 13:1015-1019.

Niswender GD and Nett T M (1994) The corpus luteum and its control in infraprimate species, in *Physiology of Reproduction* (Knobil E and Neill J eds) pp 781-816, Raven Press, New York.

Nonacs R and Cohen LS (2003) Assessment and treatment of depression during pregnancy: an update. *Psychiatric Clinics of North America* 26:547-562.

O'Connor WA and Heasman MP (1995) Spawning induction and fertilization in the doughboy scallop *Chlamys* (*Mimachlamys*) *asperima*. *Aquaculture* 136:117-129.

O'Malley BW and Strott C A (1999) Steroid hormones: metabolism and mechanism of action, in *Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management* (Yen SSC, Jaffe RB and Barbieri RL eds) pp 110-133, W.B. Saunders Company, Philadelphia.

- O'Shea JD (1970) An ultrastructural study of smooth muscle-like cells in the theca externa of ovarian follicles in the rat. *Anatomical Record* 167:127-131.
- O'Shea JD, Cran DG, Hay MF and Moor RM (1978) Ultrastructure of the theca interna of ovarian follicles in sheep. *Cell & Tissue Research* 187:457-472.
- Oh B, Hwang S, McLaughlin J, Solter D and Knowles BB (2000) - Timely translation during the mouse oocyte-to-embryo transition. *Development* 127:3795-3803.
- Okuma A, Kuraoka A, Iida H, Inai T, Wasano K and Shibata Y (1996) Colocalization of connexin 43 and connexin 45 but absence of connexin 40 in granulosa cell gap junctions of rat ovary. *Journal of Reproduction & Fertility* 107:255-264.
- Oxberry BA and Greenwald GS (1982) An autoradiographic study of the binding of ¹²⁵I-labeled follicle-stimulating hormone, human chorionic gonadotropin and prolactin to the hamster ovary throughout the estrous cycle. *Biology of Reproduction* 27:505-516.
- Ozil JP (1990) The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development* 109:117-127.
- Ozil JP and Swann K (1995) Stimulation of repetitive calcium transients in mouse eggs. *Journal of Physiology* 483:331-346.
- Palermo GD, Avrech OM, Colombero LT, Wu H, Wolny YM, Fissore RA and Rosenwaks Z (1997) Human sperm cytosolic factor triggers Ca²⁺ oscillations and overcomes activation failure of mammalian oocytes. *Molecular Human Reproduction* 3:367-374.
- Pangas SA and Matzuk MM (2004) Genetic models for transforming growth factor beta superfamily signaling in ovarian follicle development. *Molecular & Cellular Endocrinology* 225:83-91.
- Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL and Conti M (2004) EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 303:682-684.

Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T and Toth M (1998) Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:10734-10739.

Paronetto MP, Venables JP, Elliott DJ, Geremia R, Rossi P and Sette C (2003) tr-kit promotes the formation of a multimolecular complex composed by Fyn, PLC γ 1 and Sam68. *Oncogene*.

Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK and Lai FA (1996) Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 379:364-368.

Parrington J, Lai FA and Swann K (1998) A novel protein for Ca²⁺ signaling at fertilization. *Current Topics in Developmental Biology* 39:215-243.

Pasqualetti M, Ori M, Castagna M, Marazziti D, Cassano GB and Nardi I (1999) Distribution and cellular localization of the serotonin type 2C receptor messenger RNA in human brain. *Neuroscience* 92:601-611.

Patel PD, Pontrello C and Burke S (2004) Robust and tissue-specific expression of TPH2 versus TPH1 in rat raphe and pineal gland. *Biological Psychiatry* 55:428-433.

Pauwels PJ, Palmier C, Wurch T and Colpaert FC (1996) Pharmacology of cloned human 5-HT_{1D} receptor-mediated functional responses in stably transfected rat C6-glia cell lines: further evidence differentiating human 5-HT_{1D} and 5-HT_{1B} receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 353:144-156.

Pecins-Thompson M, Brown NA and Bethea CL (1998) Regulation of serotonin re-uptake transporter mRNA expression by ovarian steroids in rhesus macaques. *Brain Research Molecular Brain Research* 53:120-129.

Peng XR, Hsueh AJ, LaPolt PS, Bjersing L and Ny T (1991) Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology* 129:3200-3207.

Peroutka SJ and Howell TA (1994) The molecular evolution of G protein-coupled receptors - focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology* 33:319-324.

Perry AF, Wakayama T and Yanagimachi R (1999) A novel trans-complementation assay suggests full mammalian oocyte activation is coordinately initiated by multiple, submembrane sperm components. *Biology of Reproduction* 60:747-755.

Peters H, Byskov A G and Faber M (1973) Intraovarian regulation of follicle growth in the immature mouse, in *The Development and Maturation of the Ovary and Its Functions* (Peters H ed) pp 20-23, Excerpta Medica, Amsterdam.

Peters JA, Kelley SP, Dunlop JJ, Kirkness EF, Hales TG and Lambert JJ (2004) The 5-hydroxytryptamine type 3 (5-HT₃) receptor reveals a novel determinant of single-channel conductance. *Biochemical Society Transactions* 32:547-552.

Philpott CC, Ringuelette MJ and Dean J (1987) Oocyte-specific expression and developmental regulation of ZP3, the sperm receptor of the mouse zona pellucida. *Developmental Biology* 121:568-575.

Picton H, Briggs D and Gosden R (1998) The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular & Cellular Endocrinology* 145:27-37.

Pincus G and Enzmann EV (1935) The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. I. The activation of ovarian eggs. *Journal of Experimental Medicine* 62:665-675.

Plassat JL, Boschert U, Amlaiky N and Hen R (1992) The mouse 5HT₅ receptor reveals a remarkable heterogeneity within the 5HT_{1D} receptor family. *EMBO J* 11:4779-4786.

Plassat JL, Amlaiky N and Hen R (1993) Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Molecular Pharmacology* 229-236.

Pompeiano M, Palacios JM and Mengod G (1994) Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Research Molecular Brain Research* 23:163-178.

- Pootanakit K, Prior KJ, Hunter DD and Brunken WJ (1999) 5-HT_{2a} receptors in the rabbit retina: potential presynaptic modulators. *Visual Neuroscience* 16:221-230.
- Price GW, Burton MJ, Collin LJ, Duckworth M, Gaster L, Gothert M, Jones BJ, Roberts C, Watson JM and Middlemiss DN (1997) SB-216641 and BRL-15572--compounds to pharmacologically discriminate h₅-HT_{1B} and h₅-HT_{1D} receptors. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 356:312-320.
- Pritchett DB, Bach AW, Wozny M, Taleb O, Dal Toso R, Shih JC and Seeburg PH (1988) Structure and functional expression of cloned rat serotonin 5HT-2 receptor. *EMBO Journal* 7:4135-4140.
- Qian Y, Galli A, Ramamoorthy S, Risso S, DeFelice LJ and Blakely RD (1997) Protein kinase C activation regulates human serotonin transporters in HEK-293 cells via altered cell surface expression. *Journal of Neuroscience* 17:45-57.
- Ram JL, Croll SJ, Nichols SJ and Wall D (1992) The zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), a new pest in North America: reproductive mechanisms as possible targets of control strategies. *Invertebrate Reproduction & Development* 23:77-86.
- Ram JL, Crawford GW, Walker JU, Mojares JJ, Patel N, Fong PP and Kyojuka K (1993) Spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): activation by internal or external application of serotonin. *Journal of Experimental Zoology* 265:587-598.
- Ram JL, Fong PP and Kyojuka K (1996) Serotonergic mechanisms mediating spawning and oocyte maturation in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Invertebrate Reproduction & Development* 30:29-37.
- Ramamoorthy S and Blakely RD (1999) Phosphorylation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants. *Science* 285:763-766.
- Ramamoorthy S, Giovanetti E, Qian Y and Blakely RD (1998) Phosphorylation and regulation of antidepressant-sensitive serotonin transporters. *Journal of Biological Chemistry* 273:2458-2466.

Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D and Hen R (1998) Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:14476-14481.

Rao IM, Mills TM, Anderson E and Mahesh VB (1991) Heterogeneity in granulosa cells of developing rat follicles. *Anatomical Record* 229:177-185.

Rapport MM, Green AA and Page IH (1948) Crystalline Serotonin. *Science* 108:329-330.

Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys, TW, Grewal JS and Garnovskaya MN (2001) Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacology & Therapeutics* 92:179-212.

Rees S, den D, I, Foord S, Goodson S, Bull D, Kilpatrick G and Lee M (1994) Cloning and characterisation of the human 5-HT_{5A} serotonin receptor. *FEBS Letters* 355:242-246.

Reeves DC and Lummis SC (2002) The molecular basis of the structure and function of the 5-HT₃ receptor: a model ligand-gated ion channel. *Molecular Membrane Biology* 19:11-26.

Reilly JG, McTavish SF and Young AH (1997) Rapid depletion of plasma tryptophan: a review of studies and experimental methodology. *Journal of Psychopharmacology* 11:381-392.

Rennels EG (1951) Influence of hormones on the histochemistry of ovarian interstitial tissue in the immature rat. *American Journal of Anatomy* 88:63-107.

Richard FJ, Tsafiriri A and Conti M (2001) Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation. *Biology of Reproduction* 65:1444-1451.

Roberts AJ and Skinner MK (1991) Transforming growth factor-alpha and -beta differentially regulate growth and steroidogenesis of bovine thecal cells during antral follicle development. *Endocrinology* 129:2041-2048.

Roberts AJ, Krucker T, Levy CL, Slanina KA, Sutcliffe JG and Hedlund PB (2004) Mice lacking 5-HT receptors show specific impairments in contextual learning. *European Journal of Neuroscience* 19:1913-1922.

Roberts C, Price GW, Gaster L, Jones BJ, Middlemiss DN and Routledge C (1997) Importance of h5-HT1B receptor selectivity for 5-HT terminal autoreceptor activity: an in vivo microdialysis study in the freely-moving guinea-pig. *Neuropharmacology* 36:549-557.

Rossi P, Marziali G, Albanesi C, Charlesworth A, Geremia R and Sorrentino V (1992) A novel c-kit transcript, potentially encoding a truncated receptor, originates within a kit gene intron in mouse spermatids. *Developmental Biology* 152:203-207.

Roth BL, Willins DL, Kristiansen K and Kroeze WK (1998) 5-Hydroxytryptamine₂-family receptors (5-hydroxytryptamine_{2A}, 5-hydroxytryptamine_{2B}, 5-hydroxytryptamine_{2C}): where structure meets function. *Pharmacology & Therapeutics* 231-257.

Ruat M, Traiffort E, Leurs R, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Arrang JM and Schwartz JC (1993) Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:8547-8551.

Saidapur SK (1978) Follicular atresia in the ovaries of nonmammalian vertebrates. *International Review of Cytology* 54:225-244.

Saltzman AG, Morse B, Whitman MM, Ivanshchenko Y, Jaye M and Felder S (1991) Cloning of the human serotonin 5-HT₂ and 5-HT_{1C} receptor subtypes. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 181:1469-1478.

Salustri A, Camaioni A, Di Giacomo M, Fulop C and Hascall VC (1999) Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles. *Human Reproduction Update* 5:293-301.

Saudou F, Amara DA, Dierich A, LeMeur M, Ramboz S, Segu L, Buhot MC and Hen R (1994) Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT_{1B} receptor. *Science* 265:1875-1878.

Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K and Lai FA (2002) PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development Supplement* 129:3533-3544.

Schmuck K, Ullmer C, Engels P and Lubbert H (1994) Cloning and functional characterization of the human 5-HT_{2B} serotonin receptor. *FEBS Letters* 342:85-90.

Schroeter S, Levey AI and Blakely RD (1997) Polarized expression of the antidepressant-sensitive serotonin transporter in epinephrine-synthesizing chromaffin cells of the rat adrenal gland. *Molecular & Cellular Neuroscience* 9:170-184.

Schultz RM, LaMarca MJ and Wassarman PM (1978) Absolute rates of protein synthesis during meiotic maturation of mammalian oocytes in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75:4160-4164.

Schultz RM, Letourneau GE and Wassarman PM (1979) Program of early development in the mammal: changes in the patterns and absolute rates of tubulin and total protein synthesis during oocyte growth in the mouse. *Developmental Biology* 73:120-133.

Sebben M, Ansanay H, Bockaert J and Dumuis A (1994) 5-HT₆ receptors positively coupled to adenylyl cyclase in striatal neurones in culture. *NeuroReport* 5:2553-2557.

Sette C, Bevilacqua A, Bianchini A, Mangia F, Geremia R and Rossi P (1997) Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *Development* 124:2267-2274.

Sette C, Bevilacqua A, Geremia R and Rossi P (1998) Involvement of phospholipase Cgamma1 in mouse egg activation induced by a truncated form of the C-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *Journal of Cell Biology* 142:1063-1074.

Sette C, Paronetto MP, Barchi M, Bevilacqua A, Geremia R and Rossi P (2002) Tr-kit-induced resumption of the cell cycle in mouse eggs requires activation of a Src-like kinase. *EMBO J* 21:5386-5395.

Shen Y, Monsma FJJ, Metcalf MA, Jose PA, Hamblin MW and Sibley DR (1993) Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype. *Journal of Biological Chemistry* 268:18200-18204.

Sheng Y, Wang L, Liu XS, Montplaisir V, Tiberi M, Baltz JM and Liu XJ (2005) A serotonin receptor antagonist induces oocyte maturation in both frogs and mice: Evidence that the same G protein-coupled receptor is responsible for maintaining meiosis arrest in both species. *Journal of Cellular Physiology* 202:777-786.

Shevchenko V, Hogben M, Ekong R, Parrington J and Lai FA (1998) The human glucosamine-6-phosphate deaminase gene: cDNA cloning and expression, genomic organization and chromosomal localization. *Gene* 216:31-38.

Shibuya EK, Boulton TG, Cobb MH and Ruderman JV (1992) Activation of p42 MAP kinase and the release of oocytes from cell cycle arrest. *EMBO Journal* 11:3963-3975.

Shih JC (2004) Cloning, after cloning, knock-out mice, and physiological functions of MAO A and B. *Neurotoxicology* 25:21-30.

Shimizu M, Nishida A, Zensho H and Yamawaki S (1996) Chronic antidepressant exposure enhances 5-hydroxytryptamine₇ receptor-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation in rat frontocortical astrocytes. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 279:1551-1558.

Shiraishi K, Okada A, Shirakawa H, Nakanishi S, Mikoshiba K and Miyazaki S (1995) Developmental changes in the distribution of the endoplasmic reticulum and inositol

1,4,5-trisphosphate receptors and the spatial pattern of Ca^{2+} release during maturation of hamster oocytes. *Developmental Biology* 170:594-606.

Shitsukawa K, Andersen CB, Richard FJ, Horner AK, Wiersma A, van D, M and Conti M (2001) Cloning and characterization of the cyclic guanosine monophosphate-inhibited phosphodiesterase PDE3A expressed in mouse oocyte. *Biology of Reproduction* 65:188-196.

Shmukler YB (1993) Possibility of membrane reception of neurotransmitter in sea urchin early embryos. *Comparative Biochemistry & Physiology - C: Comparative Pharmacology & Toxicology* 106:269-273.

Shmukler YB and Buznikov GA (1998) Functional coupling of neurotransmitters with second messengers during cleavage divisions: facts and hypotheses. *Perspectives on Developmental Neurobiology* 5:469-480.

Shmukler YB, Buznikov GA and Whitaker MJ (1999) Action of serotonin antagonists on cytoplasmic calcium levels in early embryos of sea urchin *Lytechinus pictus*. *International Journal of Developmental Biology* 43:179-182.

Shuey DL, Sadler TW and Lauder JM (1992) Serotonin as a regulator of craniofacial morphogenesis: site specific malformations following exposure to serotonin uptake inhibitors. *Teratology* 46:367-378.

Shuey DL, Sadler TW, Tamir H and Lauder JM (1993) Serotonin and morphogenesis. II. Transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse. *Anatomy & Embryology* 187:75-85.

Simon AM, Goodenough DA, Li E and Paul DL (1997) Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 385:525-529.

Singh B, Rutledge JM and Armstrong DT (1995) Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Molecular Reproduction & Development* 40:391-399.

Sirotkin AV (1995) Serotonin influences hormone and cyclic nucleotide release by granulosa cells isolated from porcine ovaries. *Biogenic Amines* 11:137-146.

Skingle M, Sleight AJ and Feniuk W (1995) Effects of the 5-HT_{1D} receptor antagonist GR127935 on extracellular levels of 5-HT in the guinea-pig frontal cortex as measured by microdialysis. *Neuropharmacology* 34:377-382.

Sleight AJ, Boess FG, Bos M, Levet-Trafit B, Riemer C and Bourson A (1998) Characterization of Ro 04-6790 and Ro 63-0563: potent and selective antagonists at human and rat 5-HT₆ receptors. *British Journal of Pharmacology* 124:556-562.

Speed RM (1982) Meiosis in the foetal mouse ovary. I. An analysis at the light microscope level using surface-spreading. *Chromosoma* 85:427-437.

Stam NJ, Roesink C, Dijcks F, Garritsen A, van Herpen A and Olijve W (1997) Human serotonin 5-HT₇ receptor: cloning and pharmacological characterisation of two receptor variants. *FEBS Letters* 413:489-494.

Stefulj J, Jernej B, Cicin-Sain L, Rinner I and Schauenstein K (2000) mRNA expression of serotonin receptors in cells of the immune tissues of the rat. *Brain, Behavior, and Immunity* 14:219-224.

Stricker SA (1999) Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Developmental Biology* 211:157-176.

Stricker SA and Smythe TL (2000) Multiple triggers of oocyte maturation in nemertean worms: The roles of calcium and serotonin. *Journal of Experimental Zoology* 287:243-261.

Stricker SA and Smythe TL (2001) 5-HT causes an increase in cAMP that stimulates, rather than inhibits, oocyte maturation in marine nemertean worms. *Development* 128:1415-1427.

Sugiura K, Pendola FL and Eppig JJ (2005) Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Developmental Biology* 279:20-30.

Sumner BE and Fink G (1993) Effects of acute estradiol on 5-hydroxytryptamine and dopamine receptor subtype mRNA expression in female rat brain. *Molecular and Cellular Neurosciences* 4:83-92.

Sumner BH and Fink G (1995) Estrogen increases the density of 5-hydroxytryptamine(2A) receptors in cerebral cortex and nucleus accumbens in the female rat. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 54:15-20.

Sutovsky P, Manandhar G, Wu A and Oko R (2003) Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microscopy Research and Technique* 61:362-378.

Swann K (1990) A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development* 110:1295-1302.

Swann K (1994) Ca^{2+} oscillations and sensitization of Ca^{2+} release in unfertilized mouse eggs injected with a sperm factor. *Cell Calcium* 15:331-339.

Swann K and Lai FA (1997) A novel signalling mechanism for generating Ca^{2+} oscillations at fertilization in mammals. *Bioessays* 19:371-378.

Swann K and Ozil JP (1994) Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *International Review of Cytology* 152:183-222.

Swenson KI, Piwnica-Worms H, McNamee H and Paul DL (1990) Tyrosine phosphorylation of the gap junction protein connexin43 is required for the pp60v-src-induced inhibition of communication. *Cell Regulation* 1:989-1002.

Tanaka E, Baba N, Toshida K and Suzuki K (1993) Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT₂ receptor. *Life Sciences* 53:563-570.

Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M and de Kruif A (2002) Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction & Development* 61:414-424.

Tecott LH, Logue SF, Wehner JM and Kauer JA (1998) Perturbed dentate gyrus function in serotonin 5-HT_{2C} receptor mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:15026-15031.

Terranova PF, Uilenbroek JT, Saville L, Horst D and Nakamura Y (1990) Serotonin enhances oestradiol production by hamster preovulatory follicles in vitro: effects of experimentally induced atresia. *Journal of Endocrinology* 125:433-438.

Tesarik J and Mendoza C (1999) In vitro fertilization by intracytoplasmic sperm injection. *Bioessays* 21:791-801.

Tesarik J, Sousa M and Testart J (1994) Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 9:511-518.

Thomas DR, Gittins SA, Collin LL, Middlemiss DN, Riley G, Hagan J, Gloger I, Ellis CE, Forbes IT and Brown AM (1998) Functional characterisation of the human cloned 5-HT₇ receptor (long form); antagonist profile of SB-258719. *British Journal of Pharmacology* 124:1300-1306.

Thorpe LW, Westlund KN, Kochersperger LM, Abell CW and Denney RM (1987) Immunocytochemical localization of monoamine oxidases A and B in human peripheral tissues and brain. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 35:23-32.

Tinajero JC, Fabbri A and Dufau ML (1992) Regulation of corticotropin-releasing factor secretion from Leydig cells by serotonin. *Endocrinology* 130:1780-1788.

Tinajero JC, Fabbri A, Ciocca DR and Dufau ML (1993) Serotonin secretion from rat Leydig cells. *Endocrinology* 133:3026-3029.

To ZP, Bonhaus DW, Eglen RM and Jakeman LB (1995) Characterization and distribution of putative 5-HT₇ receptors in guinea-pig brain. *British Journal of Pharmacology* 115:107-116.

Tsafiri A and Channing CP (1975) An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis in vitro. *Endocrinology* 96:922-927.

Tsafiri A, Pomerantz SH and Channing CP (1976) Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluid: partial characterization of the inhibitor. *Biology of Reproduction* 14:511-516.

Tsang BK, Moon YS, Simpson CW and Armstrong DT (1979) Androgen biosynthesis in human ovarian follicles: cellular source, gonadotropic control, and adenosine 3',5'-monophosphate mediation. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 48:153-158.

Tsou AP, Kosaka A, Bach C, Zuppan P, Yee C, Tom L, Alvarez R, Ramsey S, Bonhaus DW, Stefanich E and . (1994) Cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ receptor positively coupled to adenylyl cyclase. *Journal of Neurochemistry* 63:456-464.

Ullmer C, Schmuck K, Kalkman HO and Lubbert H (1995) Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Letters* 370:215-211.

Valdimarsson G, De Sousa PA and Kidder GM (1993) Coexpression of gap junction proteins in the cumulus-oocyte complex. *Molecular Reproduction & Development* 36:7-15.

Van Blerkom J, Antczak M and Schrader R (1997) The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Human Reproduction* 12:1047-1055.

Van Der Vusse GJ, Kalkman ML and Van Der Molen HJ (1975) Endogenous steroid production in cellular and subcellular fractions of rat testis after prolonged treatment with gonadotropins. *Biochim Biophys Acta* 380:473-485.

Vanderhyden B (2002) Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience* 7:d2006-d2022.

Vanderhyden BC, Telfer EE and Eppig JJ (1992) Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro. *Biology of Reproduction* 46:1196-1204.

Verhofstad AA and Jonsson G (1983) Immunohistochemical and neurochemical evidence for the presence of serotonin in the adrenal medulla of the rat. *Neuroscience* 10:1443-1453.

Vesela J, Rehak P, Mihalik J, Czikkova S, Pokorny J and Koppel J (2003) Expression of serotonin receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Physiological Research* 52:223-228.

Vilaro MT, Domenech T, Palacios JM and Mengod G (2002) Cloning and characterization of a novel human 5-HT₄ receptor variant that lacks the alternatively spliced carboxy terminal exon. RT-PCR distribution in human brain and periphery of multiple 5-HT₄ receptor variants. *Neuropharmacology* 42:60-73.

Vitale ML and Chiocchio SR (1993) Serotonin, a neurotransmitter involved in the regulation of luteinizing hormone release. *Endocrine Reviews* 14:480-493.

Vitullo AD and Ozil JP (1992) Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Developmental Biology* 151:128-136.

Walther DJ and Bader M (1999) Serotonin synthesis in murine embryonic stem cells. *Brain Research Molecular Brain Research* 68:55-63.

Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, Fink H and Bader M (2003a) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 299:76.

Walther DJ, Peter JU, Winter S, Holtje M, Paulmann N, Grohmann M, Vowinckel J, Alamo-Bethencourt V, Wilhelm CS, Ahnert-Hilger G and Bader M (2003b) Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell* 115:851-862.

Wang C, Hsueh AJ and Erickson GF (1982) The role of cyclic AMP in the induction of estrogen and progestin synthesis in cultured granulosa cells. *Molecular & Cellular Endocrinology* 25:73-83.

Wang D, Post M and Cutz E (1999) Expression of serotonin receptor 2c in rat type II pneumocytes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 20:1175-1180.

Wang S, Gebre-Medhin S, Betsholtz C, Stalberg P, Zhou Y, Larsson C, Weber G, Feinstein R, Oberg K, Gobl A and Skogseid B (1998) Targeted disruption of the mouse phospholipase C beta3 gene results in early embryonic lethality. *FEBS Letters* 441:261-265.

Wang XN and Greenwald GS (1993a) Hypophysectomy of the cyclic mouse. I. Effects on folliculogenesis, oocyte growth, and follicle-stimulating hormone and human chorionic gonadotropin receptors. *Biology of Reproduction* 48:585-594.

Wang XN and Greenwald GS (1993b) Hypophysectomy of the cyclic mouse. II. Effects of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone on folliculogenesis, FSH and human chorionic gonadotropin receptors, and steroidogenesis. *Biology of Reproduction* 48:595-605.

Wang XN, Roy SK and Greenwald GS (1991) In vitro DNA synthesis by isolated preantral to preovulatory follicles from the cyclic mouse. *Biology of Reproduction* 44:857-863.

Wassarman PM (1988a) The mammalian ovum, in *The Physiology of Reproduction* (Knobil E and Neill J eds) pp 69-102, Raven Press, New York.

Wassarman PM (1988b) Zona pellucida glycoproteins. *Annual Review of Biochemistry* 57:415-442.

Wassarman PM (1994) The mammalian ovum, in *The Physiology of Reproduction* (Knobil E and Neill J eds) pp 79-122, Raven Press, New York.

Wassarman PM and DePamphilis M L (1993) *Guide to Techniques in Mouse Development*. Academic Press, San Diego.

Wassarman PM and Josefowicz WJ (1978) Oocyte development in the mouse: an ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. *Journal of Morphology* 156:209-235.

Watson JA, Elliott AC and Brown PD (1995) Serotonin elevates intracellular Ca^{2+} in rat choroid plexus epithelial cells by acting on 5-HT_{2C} receptors. *Cell Calcium* 17:120-128.

Webb RJ, Bains H, Cruttwell C and Carroll J (2002a) Gap-junctional communication in mouse cumulus-oocyte complexes: implications for the mechanism of meiotic maturation. *Reproduction* 123:41-52.

Webb RJ, Marshall F, Swann K and Carroll J (2002b) Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase a in mammalian oocytes. *Developmental Biology* 246:441-454.

Weiss ER, Maness P and Lauder JM (1998) Why do neurotransmitters act like growth factors? *Perspectives on Developmental Neurobiology* 5:323-335.

Westlund KN, Denney RM, Kochersperger LM, Rose RM and Abell CW (1985) Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain. *Science* 230:181-183.

Wilkie TM, Chen Y, Gilbert DJ, Moore KJ, Yu L, Simon MI, Copeland NG and Jenkins NA (1993) Identification, chromosomal location, and genome organization of mammalian G-protein-coupled receptors. *Genomics* 18:175-184.

Wisden W, Parker EM, Mahle CD, Grisel DA, Nowak HP, Yocca FD, Felder CC, Seeburg PH and Voigt MM (1993) Cloning and characterization of the rat 5-HT_{5B} receptor. Evidence that the 5-HT_{5B} receptor couples to a G protein in mammalian cell membranes. *FEBS Letters* 333:25-31.

Wolny YM, Fissore RA, Wu H, Reis MM, Colombero LT, Ergun B, Rosenwaks Z and Palermo GD (1999) Human glucosamine-6-phosphate isomerase, a homologue of hamster oscillin, does not appear to be involved in Ca²⁺ release in mammalian oocytes. *Molecular Reproduction & Development* 52:277-287.

Wolosker H, Kline D, Bian Y, Blackshaw S, Cameron AM, Fralich TJ, Schnaar RL and Snyder SH (1998) Molecularly cloned mammalian glucosamine-6-phosphate deaminase localizes to transporting epithelium and lacks oscillin activity. *FASEB Journal* 12:91-99.

Woolley ML, Marsden CA and Fone KC (2004) 5-HT₆ receptors. *Current Drug Targets CNS & Neurological Disorders* 3:59-79.

Wordinger RJ, Rudick VL and Rudick MJ (1983) Immunohistochemical localization of laminin within the mouse. *Journal of Experimental Zoology* 228:141-143.

Wright CS, Becker DL, Lin JS, Warner AE and Hardy K (2001) Stage-specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation. *Reproduction* 121:77-88.

Wu H, He CL and Fissore RA (1997) Injection of a porcine sperm factor triggers calcium oscillations in mouse oocytes and bovine eggs. *Molecular Reproduction & Development* 46:176-189.

Wu H, He CL, Jehn B, Black SJ and Fissore RA (1998) Partial characterization of the calcium-releasing activity of porcine sperm cytosolic extracts. *Developmental Biology* 203:369-381.

- Yang W, Chen K, Lan NC, Gallaher TK and Shih JC (1992) Gene structure and expression of the mouse 5-HT₂ receptor. *Journal of Neuroscience Research* 33:196-204.
- Yavarone MS, Shuey DL, Sadler TW and Lauder JM (1993a) Serotonin uptake in the ectoplacental cone and placenta of the mouse. *Placenta* 14:149-161.
- Yavarone MS, Shuey DL, Tamir H, Sadler TW and Lauder JM (1993b) Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. *Teratology* 47:573-584.
- Yi JH, Lefievre L, Gagnon C, Anctil M and Dube F (2002) Increase of cAMP upon release from prophase arrest in surf clam oocytes. *Journal of Cell Science* 115:311-320.
- Yoffe JR and Borchardt RT (1982) Characterization of serotonin uptake in cultured pheochromocytoma cells. Comparison with norepinephrine uptake. *Molecular Pharmacology* 21:368-373.
- Yoshida H, Takakura N, Kataoka H, Kunisada T, Okamura H and Nishikawa SI (1997) Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental Biology* 184:122-137.
- Yoshimoto Y, Sakumoto T, Arai R, Miyake A, Kimura H, Aono T, Tanizawa O and Maeda T (1986) Monoamine oxidase in rat ovary during the estrous cycle. A histochemical study by a new coupled peroxidatic oxidation method. *Endocrinology* 119:1800-1804.
- Yu L, Nguyen H, Le H, Bloem LJ, Kozak CA, Hoffman BJ, Snutch TP, Lester HA, Davidson N and Lubbert H (1991) The mouse 5-HT_{1C} receptor contains eight hydrophobic domains and is X-linked. *Brain Research Molecular Brain Research* 11:143-149.
- Zahniser NR and Doolen S (2001) Chronic and acute regulation of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters: drugs, substrates, presynaptic receptors, and signaling systems. [Review] [306 refs]. *Pharmacology & Therapeutics* 92:21-55.

Zeitz KP, Guy N, Malmberg AB, Dirajlal S, Martin WJ, Sun L, Bonhaus DW, Stucky CL, Julius D and Basbaum AI (2002) The 5-HT₃ subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *Journal of Neuroscience* 22:1010-1019.

Zelevnik AJ, Midgley AR, Jr. and Reichert LE, Jr. (1974) Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 95:818-825.

Zelevnik AJ, Schuler HM and Reichert LE, Jr. (1981) Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology* 109:356-362.

Zhu MY and Juorio AV (1995) Aromatic L-amino acid decarboxylase: biological characterization and functional role. *General Pharmacology* 26:681-696.

Zhuang X, Gross C, Santarelli L, Compan V, Trillat AC and Hen R (1999) Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} receptors. *Neuropsychopharmacology* 21:52S-60S.

Zill P, Buttner A, Eisenmenger W, Bondy B and Ackenheil M (2004) Regional mRNA expression of a second tryptophan hydroxylase isoform in postmortem tissue samples of two human brains. *European Neuropsychopharmacology* 14:282-284.

Zoller LC (1984) A comparison of rat and hamster preovulatory follicles: an examination of differences in morphology and enzyme activity using qualitative and quantitative analyses. *Anatomical Record* 210:279-291.

Zoller LC and Enelow R (1983) A quantitative histochemical study of lactate dehydrogenase and succinate dehydrogenase activities in the membrana granulosa of the ovulatory follicle of the rat. *Histochemical Journal* 15:1055-1064.

Zoller LC and Weisz J (1978) Identification of cytochrome P-450, and its distribution in the membrana granulosa of the preovulatory follicle, using quantitative cytochemistry. *Endocrinology* 103:310-313.

Zoller LC and Weisz J (1979) A quantitative cytochemical study of glucose-6-phosphate dehydrogenase and delta 5-3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the membrana granulosa of the ovulable type of follicle of the rat. *Histochemistry* 62:125-135.

Zolti M, Meirom R, Shemesh M, Wollach D, Mashiach S, Shore L and Rafael ZB (1990) Granulosa cells as a source and target organ for tumor necrosis factor-alpha. *FEBS Letters* 261:253-255.



Đáp án: 14-20